

**Résumés des projets utilisant des animaux à des fins scientifiques autorisés  
du 1<sup>er</sup> septembre 2021 au 31 décembre 2021**

**19798** La sclérose en plaques est une maladie engendrant des troubles neurologiques et cognitifs graves causée par une inflammation au niveau du système nerveux central. Cette maladie touche environ 80 000 personnes en France, plus particulièrement les trentenaires pour lesquels elle est la première cause de handicap sévère non traumatique. En dépit d'une recherche intensive dans ce domaine, il n'existe pas de traitement efficace de cette maladie.

Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes. Une fraction des Ac, présents chez les individus sains, a la capacité de lier différents signaux de danger. Ce sont des molécules pro-inflammatoires, potentiellement toxiques qui sont relarguées à l'extérieur des cellules en cas de lésions cellulaires ou tissulaires. La capacité qu'ont certains Ac du répertoire immunitaire d'interagir avec ces signaux de danger pourrait jouer un rôle régulateur dans l'homéostasie de l'organisme. Nos travaux précédents ont démontré que la liaison d'un signal de danger aux Ac a la capacité de leur conférer de nouvelles spécificités de liaisons aux antigènes, ce qui leur permet d'accroître leur potentiel de reconnaissance antigénique. Cette augmentation de capacité de liaison des Ac aux antigènes corrèle avec l'acquisition d'un fort potentiel anti-inflammatoire, comme il l'a été démontré *in vitro*.

Le rôle physiologique des Ac capables de lier des signaux de danger n'est pas bien élucidé. Le relargage extracellulaire de certaines petites molécules se produit uniquement à la suite d'états pathologiques accompagnés par une lésion cellulaire / tissulaire étendue et une inflammation sévère. Il a été démontré que certains signaux de danger, lorsqu'ils sont libérés, ont un potentiel pro-inflammatoire puissant et exacerbent l'inflammation, ce qui contribue à la pathologie.

Les modèles animaux sont indispensables à une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. En effet, les interactions complexes entre les cellules du système immunitaire et du système nerveux central ne peuvent pas être modélisées de manière adéquate *in vitro*. Le modèle le plus largement utilisé pour les études expérimentales de la sclérose en plaques est l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (experimental autoimmune encephalomyelitis – EAE) chez la souris.

Nos études préliminaires nous permettent de supposer que les Ac capables de lier des signaux de danger peuvent avoir un intérêt thérapeutique dans la sclérose en plaques. Ainsi, le but de ce projet est d'évaluer le potentiel thérapeutique de ces Ac dans un modèle murin d'EAE. L'effet thérapeutique de ces Ac peut être médié par deux activités : (1) capture des molécules pro-inflammatoires qui sont relarguées du compartiment intracellulaire en cas d'inflammation aiguë et (2) acquisition de propriétés anti-inflammatoires du complexe signaux de dangers-Ac. La complexité de la pathogénèse de la sclérose en plaques implique l'utilisation de systèmes *in vivo* pour l'évaluation de nouvelles thérapies. Si la thérapie Ac s'avère efficace, elle pourrait être à la base d'études translationnelles qui contribueraient à améliorer la prise en charge de la sclérose en plaques

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 265 souris C57BL/6. Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole.

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 biologique. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes *in vitro* pour analyses ultérieures.

Réduction : Un criblage *in vitro* sera réalisé pour sélectionner les Ac monoclonaux les plus efficaces et qui seront ensuite utilisés pour les expériences *in vivo*. Les procédures expérimentales sont optimisées pour d'abord déterminer les concentrations optimales d'Ac injectées chez un petit nombre de souris. Cela permettra de réduire le nombre de souris pour les expériences comparatives. 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 deux à trois fois maximum. Les organes, sérum et cellules des souris euthanasiées en fin d'expérience sont conservés; ainsi, aucune expérience supplémentaire ne doit être faite si des questions nouvelles surviennent.

Raffinement : L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. 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).

**19799** Le lymphome est une forme de cancer qui touche plus de 100 000 personnes en France. Il provoque le décès de près de 5000 personnes par an, ce qui en fait le 9e cancer en terme de mortalité.

Les anticorps (Acs) jouent un rôle important dans la défense immunitaire contre les agents pathogènes. Les Acs monoclonaux sont des outils thérapeutiques efficaces pour le traitement du cancer et des maladies auto-immunes notamment grâce à leur forte spécificité vis-à-vis de leur cible et à leurs propriétés pharmacocinétiques uniques.

La plupart des Acs du répertoire immunitaire d'un individu sain sont dirigés contre les agents pathogènes. Cependant, une partie de ces Acs ont la capacité de lier des petites molécules pro-inflammatoires, relarguées à l'extérieur des cellules lorsque celles-ci sont lésées. La capacité de ces Acs à interagir avec ces molécules pourrait être un mécanisme de régulation physiologique de l'homéostasie de l'organisme. Nous avons précédemment montré que la liaison de certaines de ces molécules aux Acs circulants a la capacité de conférer à ces Acs de nouvelles spécificités de liaison à l'antigène, et ainsi d'étendre leur potentiel de reconnaissance antigénique. Ce phénomène est corrélé à une augmentation de l'activité anti-inflammatoire des Acs. Le rôle physiologique de ce phénomène n'est pas élucidé.

De plus, la propriété qu'ont certains anticorps de se lier à une large variété de petites molécules pourrait être exploitée comme base de stratégies pour la libération ciblée de substances thérapeutiques à des sites précis de l'organisme.

Nous avons démontré *in vitro* que des Acs monoclonaux thérapeutiques utilisés actuellement en clinique pour le traitement de cancer peuvent se lier à ces molécules. Le Rituximab est un Ac chimérique anti-CD20, utilisé avec succès pour le traitement de différents types d'hémopathies B malignes. Nos résultats *in vitro* montrent que le Rituximab peut se lier à des petites molécules pro-inflammatoires et que cette interaction change son répertoire de reconnaissance antigénique. Nous avons également observé que cette liaison est corrélée à une augmentation de l'activité cytotoxique du Rituximab sur une lignée de lymphome B *in vitro*. Nos résultats nous incitent à étudier leur pertinence *in vivo*.

Dans le but d'évaluer le rôle de la liaison des petites molécules pro-inflammatoires et l'élargissement du répertoire d'antigènes reconnus sur l'efficacité thérapeutique d'un Ac anti-CD20 tel que le Rituximab, nous utiliserons un modèle murin de lymphome : des cellules de thymome de souris exprimant le CD20 humain seront injectées chez des souris qui seront ensuite traitées par un anticorps de souris anti-CD20 humain. Nos données préliminaires *in vitro* indiquent que l'Ac anti-CD20 se lie à ce type de molécules pro-inflammatoires et acquiert un potentiel de reconnaissance antigénique plus large, faisant ainsi de cet Ac un candidat idéal pour étudier comment cette liaison peut moduler l'activité thérapeutique des Acs anti-cancer. Nous utiliserons ce modèle également pour évaluer la capacité de l'Ac anti-CD20 à délivrer spécifiquement des composés cytotoxiques

aux cellules de lymphome. Les résultats obtenus seront importants pour la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques avec les Acs monoclonaux.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 180 souris C57Bl/6. Pour la réalisation de cette étude, nous regrouperons les expérimentations dans le but de restreindre le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. Nos études in vitro nous encouragent à poursuivre cette étude in vivo dans un modèle expérimental de lymphome, toutefois, l'étude sera interrompue si les expériences initiales invalident l'hypothèse de travail. L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal.

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 biologique. 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 deux à trois 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 : L'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. 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. Des points limites ont été définis pour chaque procédure. Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie et l'administration d'un analgésique est prévu pour limiter la 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).

**19800** Le projet, réalisé dans un cadre réglementaire, a comme objectif de permettre l'évaluation du potentiel toxique d'un candidat médicament pendant son développement pré-clinique. Conformément aux lignes directrices ICH guideline M3(R2), ICH-S6, ICH-S9 et EMA/CPMP/ICH/286/1995; December 2009, la réalisation de ce projet est indispensable pour chaque nouveau candidat médicament avant de démarrer les essais cliniques chez l'homme, et avant toute autorisation de mise sur le marché. Le candidat médicament testé peut aussi être destiné aux soins vétérinaires.

Il n'existe pas de méthode alternative in vitro pour ce type de procédure de traitement identique à celle utilisée chez l'homme, en raison notamment de la complexité que représente un organisme vivant.

La réglementation internationale requiert l'utilisation en recherche biomédicale d'une espèce rongeur et d'une espèce non-rongeur, le chien dans le cadre de ce projet. L'espèce est déterminée en fonction des homologues avec l'homme, ainsi que des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée. Chez le chien, on évalue les effets après un jour ou plusieurs semaines de traitement en fonction de la durée de traitement souhaitée/possible chez l'Homme.

Pour les médicaments vétérinaires, les études sont généralement à réaliser dans l'espèce cible, telle que le chien, compte tenu de la spécificité de chaque espèce animale.

Ce projet consiste en 3 procédures qui englobent toutes les études nécessaires au développement préclinique d'un candidat médicament chez le chien (études préliminaires, subchroniques et chroniques) dont l'investigation des effets sur la fonction cardiovasculaire (principalement l'électrocardiogramme) et/ou respiratoire par la télémétrie ; la durée des études varie de 1 jour à 52 semaines (ou plus si jugé nécessaire par les Autorités), par la voie d'administration et selon le même schéma de traitement utilisés en clinique. Toutes les études seront conduites dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

L'espèce est déterminée en fonction des homologies avec l'homme, ou des études réglementaires prévues ou déjà réalisées dans une espèce donnée.

Le nombre d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet varie selon le protocole expérimental et est déterminé a minima afin d'obtenir des résultats robustes et de respecter les lignes directrices en vigueur. Il est attendu d'utiliser au maximum 1440 animaux sur la durée du projet (3 ans).

Les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques. Les animaux sont hébergés en groupe dans des enclos/box conformes à la Directive 2010/63 sauf en cas d'incompatibilité sociale et/ou de conditions expérimentales particulières. Un soin particulier est accordé à l'enrichissement (renforcement positif, jouets, musique, ...).

Tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément à des procédures éthiquement acceptées. Si nécessaire, l'administration du composé à tester est réalisée sous anesthésie générale pour permettre une injection en toute sécurité et sans douleur (voie intra articulaire par exemple), et l'on peut recourir à l'usage d'analgésiques pour diminuer la douleur si elle n'a pas pu être évitée. Les doses de produit sont choisies en vue d'éviter toute toxicité excessive, néanmoins, des soins adéquats seront appliqués pour éviter l'inconfort. Les animaux sont observés quotidiennement pendant toute la durée de l'étude pour détecter tout signe de réaction au traitement ou tout signe clinique fortuit.

Depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, l'état de santé des animaux est contrôlé tous les jours et évalué par rapport à des points limites définis de façon à éviter tout inconfort/souffrance prolongé. Si nécessaire, un vétérinaire peut intervenir, mais 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.

**19801** La fécondation chez les mammifères est un processus très sensible aux perturbations du métabolisme. De faibles variations de l'activité métabolique au cours des premiers stades de la fécondation peuvent orienter le développement embryonnaire ainsi que la croissance des animaux issus de ces différents embryons. Au moment de la fécondation, chez tous les mammifères, le calcium est le premier messager intracellulaire impliqué dans l'activation du métabolisme de l'œuf. Une fois déclenchée, la dynamique des signaux calciques provoque un ensemble de remaniements qui permet la mise en route du développement embryonnaire.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués lors de l'élaboration du phénotype (ensemble des caractères observables) d'un individu dès le début de la fécondation. Nous comparerons les effets de différents milieux de culture utilisés en fécondation *in vitro* sur les taux de naissance et de croissance des animaux issus de ces embryons dans le but d'optimiser la composition de ces milieux. Nous étudierons les relations entre les différents milieux de culture et l'activité métabolique de l'œuf au moment de la fécondation ainsi que les conséquences à long terme chez l'adulte et proposerons une méthode de mesure quantitative de l'impact de ces différents milieux sur l'activité métabolique des embryons.

Pour évaluer l'effet des milieux de culture utilisés pour la fécondation *in vitro* sur l'activité métabolique de l'œuf au moment de la fécondation et sur son développement, nous injecterons des spermatozoïdes dans des ovocytes et nous les placerons dans différents milieux de culture. Nous enregistrerons et analyserons les réponses calciques et nous établirons des corrélations avec les composants de ces milieux de culture. D'autre part, nous transférerons des ovocytes fécondés *in vitro*, incubés en présence de ces milieux de culture, dans des femelles receveuses et nous étudierons la croissance des animaux obtenus.

Ce projet sera réalisé chez la souris et nécessitera l'utilisation de 1070 souris sur cinq ans. Leur nombre a été réduit au maximum afin d'obtenir des données suffisantes et avoir une bonne estimation statistique de la variabilité des réponses métaboliques. Seuls des animaux peuvent être utilisés pour établir des corrélations entre l'activité métabolique des œufs à la fécondation et les milieux de culture, et étudier les effets à long terme chez l'adulte. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance et limiter tout stress lors des interventions sur les animaux.

Le suivi quotidien des animaux hébergés dans un environnement enrichi (papier de ouate) et l'application de critères d'arrêts de l'expérience permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance et de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie, en accord avec la cellule bien-être animal de l'installation expérimentale.

**19802** Au niveau mortalité, en France le cancer du côlon se trouve au 2<sup>e</sup> rang derrière le cancer du poumon, et au 4<sup>ème</sup> rang mondial, ce qui en fait un véritable enjeu de santé publique. Les facteurs de risques environnementaux et génétiques permettant le développement de ce cancer sont complexes et hétérogènes. Le mode de vie, l'alimentation, et des mutations somatiques/germinales en font partie. Au niveau génétique, plusieurs étapes se succèdent et nécessitent une accumulation de mutations de gènes. Récemment il a été observé que l'expression de l'Apeline, une hormone ainsi que celle de son récepteur APJ, sont augmentées au cours de certains cancers, y compris le cancer colorectal. Dans ce projet de recherche nous évaluerons directement l'implication de l'apeline et de son récepteur dans le cancer colorectal en utilisant les souris déficientes pour l'apeline ou le récepteur APJ. Dans des souris normales, des souris déficientes pour APJ et des souris déficientes pour apeline, nous voulons induire chimiquement des tumeurs dans le colon. Nous pourrions ainsi évaluer l'importance et le rôle de ces deux molécules dans la progression du cancer colorectal.

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

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

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

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

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

**19803** Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez l'animal en vue de mieux comprendre les effets d'un produit et/ou d'en limiter les impacts chez l'Homme. A ce jour, il n'existe pas, pour ces études, d'alternative complète validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux.

Ces études pourront être réalisées chez des espèces rongeurs et/ou non-rongeurs, selon l'effet étudié. Les primates non-humains (macaque cynomolgus) ne seront utilisés que si les autres non-rongeurs ne permettent pas de répondre aux objectifs du projet en tenant compte des éléments suivants:

- Similarité des paramètres cinétiques ou du métabolisme entre l'espèce non-rongeur choisie et l'Homme

- Réponse pharmacologique ou toxicologique spécifique observée seulement chez le primate non humain et l'homme

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives *in vitro* et *in silico* sont utilisées au préalable pour affiner la recherche et réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les études incluses dans ce projet ont une durée pouvant aller jusqu'à 6 mois, selon le mode d'administration prévu chez l'Homme. Les voies d'administrations (orale ou parentérale) sont celles prévues chez l'Homme. Des examens réguliers, à l'aide de matériel adapté à chaque espèce et à l'effet étudié, incluent généralement observations cliniques, prise de température corporelle (mesure rectale), prélèvements de sang, pour étudier des biomarqueurs et vérifier le passage du médicament dans le sang (par microsampling chaque fois que c'est possible pour raffinement), examen cardiologique (ECG ou mesure de pression artérielle généralement par télémétrie non invasive), collecte d'urines (via des entonnoirs placés sous les unités d'hébergement pour raffinement), examen ophtalmologique ou tout autre examen spécifique pouvant aider à la compréhension de l'effet étudié.

Les animaux sont régulièrement entraînés à des manipulations et, des procédures de renforcement positifs (récompenses, jeux) sont régulièrement mises en œuvre. Certains animaux peuvent être ré-utilisés si les conditions sont conformes à la réglementation. Les autres animaux sont sacrifiés en fin d'étude pour examiner les différents organes d'intérêt. Le nombre d'animaux utilisé dans ces études est fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude. Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter ainsi toute souffrance inutile.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant les mécanismes de leur toxicité éventuelle, en sélectionnant de manière plus spécifique d'autres candidats de la même classe pharmacologique ou d'autres modes d'administration et en diminuant le risque pour l'Homme.

Selon le nombre de candidats médicaments qui nécessiteraient la mise en place de telles études « *in vivo* », un maximum de 500 rongeurs, 50 lagomorphes, 75 chiens ou 75 singes pourrait être utilisé (dont des animaux ré-utilisés) sur 5 ans.

**19804** L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'inocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardio-vasculaires chez le chien vigile en utilisant la télémétrie.

D'autres évaluations pourront être réalisées en parallèle de l'enregistrement des paramètres cardio-vasculaires par télémétrie, tels que des observations et réalisations de tests neuro-comportementaux ou des évaluations pharmacocinétiques.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 160 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 chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. 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 chien est l'espèce recommandée pour ce type de modèle d'étude.

- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi de signes cliniques et 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 adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire

**19805** L'importance de l'infarctus du myocarde et ses conséquences en termes d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardio-vasculaire en font un problème de santé publique majeur dans les pays développés.

La taille de l'infarctus est le facteur majeur du pronostic après infarctus du myocarde aigu. Les interventions visant à réduire la taille finale de la lésion ont donc un intérêt clinique majeur pour améliorer le pronostic des patients pris en charge pour infarctus du myocarde. La prise en charge actuelle de l'infarctus du myocarde vise à ré-alimenter le cœur en sang oxygéné (reperfusion) le plus rapidement possible. Cependant des études expérimentales et cliniques ont montré qu'une reperfusion brutale a trop souvent des effets secondaires sur le myocarde ischémique, induisant des lésions supplémentaires. Ces dommages survenant après reperfusion peuvent participer jusqu'à 40% de la taille finale de l'infarctus.

Des études préliminaires sur des modèles cellulaires, ont permis de valider l'effet potentiellement protecteur des ultrasons. Toutefois, ces résultats, bien que très encourageants, sont très éloignés de la réalité clinique où les ultrasons doivent prouver leur efficacité en application directe sur l'organe. L'objectif étant une application humaine de cette technologie, seul un modèle sur gros animal, qui présente une physiologie coronaire et cardiaque très semblable à l'homme permettra d'avancer sur cette problématique. L'espèce animale choisie pour notre étude est le porc de taille réduite (lignée FBM), dans lequel nous induirons un infarctus d'intensité similaire à celui retrouvé chez l'homme, nous effectuerons la reperfusion couplée à nos deux propositions thérapeutiques innovantes, dont nous espérons qu'elles permettront de réduire les effets délétères du traitement actuel. Cette étape expérimentale permettra de suivre chronologiquement la mise en place de la lésion ischémique, puis d'étudier l'efficacité de chacune des thérapies proposées pour limiter les effets délétères de la reperfusion.

L'objectif du projet de recherche est de valider deux nouvelles stratégies thérapeutiques de protection du myocarde, dites de sono-cardioprotection, sur un modèle d'infarctus réalisé chez le Porc, étape cruciale et préalable à toute étude clinique ultérieure. Deux modes d'applications des ultrasons comme stratégie thérapeutique non-invasive seront testées : la mécano-transduction (Shock-Wave) et les ultrasons focalisés de basses intensités (LIPUS). Toutes deux ont été utilisées pour déposer de l'énergie ultra-sonore à différentes intensités dans des endroits focalisés des tissus, avec des utilisations en routine clinique dans le domaine de l'oncologie et en urologie.

L'évaluation de la méthode et sa validation combinera i) l'imagerie pour explorer le retentissement de l'infarctus du myocarde et des thérapies adjuvantes au niveau du cœur, notamment au niveau inflammatoire ii) des prélèvements sanguins et tissulaires pour des analyses histologiques, biologiques pour relier l'imagerie macroscopique et le niveau cellulaire.

Ce protocole nécessite la mise en place d'un modèle expérimental à thorax ouvert avec un maximum de 70 porcs. Il sera réalisé sur animaux profondément endormis, sous anesthésie générale. Une prise en charge de la douleur due à la chirurgie est prévue. A l'issue de ce protocole l'animal est euthanasié sans réveil.

Après expérimentation, du matériel biologique (organes, tissus) pourra être prélevé. Ces prélèvements pourront éventuellement servir pour les besoins d'autres études non liées à ce protocole, sans utiliser d'animaux supplémentaires.

Les porcs sont hébergés dans les conditions adaptées à leur espèce, logés sur copeaux, en groupes sociaux, avec jeux à leur disposition. Un suivi quotidien leur est apporté. Un vétérinaire assure le suivi sanitaire.

**19806** Avenant au projet. Les douleurs chroniques sont très fréquentes et les traitements disponibles souvent peu efficaces. Une des raisons à cet échec est qu'il n'y a pas une mais des douleurs chroniques. En effet, les douleurs chroniques se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, et douleurs provoquées par une stimulation normalement non douloureuse (allodynie) ou douloureuse (hyperalgésie). Chaque symptôme dépendant de mécanismes distincts, un médicament efficace sur l'un ne le sera donc pas nécessairement sur un autre : d'où la nécessité de traitements spécifiques pour chacun d'eux.

Nous nous intéressons aux mécanismes de l'allodynie mécanique, un des symptômes les plus fréquents observés chez les patients douloureux chroniques. Comment le toucher devient-il douleur ? Normalement, ces sensations sont indépendantes. Les nerfs véhiculant les messages douloureux se terminent dans les couches superficielles de la moelle épinière et ceux véhiculant les messages tactiles dans les couches profondes. Cependant, suite à une lésion nerveuse ou une inflammation périphérique, les informations tactiles peuvent accéder aux neurones de la douleur des couches superficielles via un 'court-circuit' et provoquer ainsi une allodynie mécanique. Un petit nombre de neurones appartenant à ce circuit a été identifié, mais le manque d'informations concernant le réseau dans son ensemble et ses caractéristiques propres constituent une barrière majeure contre la mise en place d'une thérapeutique ciblée et efficace. Quels sont les autres neurones ? Comment l'information tactile se propage-t-elle à travers ce circuit ? Grâce à des traceurs transynaptiques viraux injectés chez des souris génétiquement modifiées pour faire exprimer ces virus uniquement dans des sous-populations de neurones, nous déterminerons la connectivité synaptique des populations neuronales existant au niveau de la corne dorsale et déterminerons leur potentiel thérapeutique à l'aide de vecteurs pharmacogénétiques. Les résultats permettront d'aider au développement de thérapies spécifiques.

Pour ce projet, l'utilisation de souris transgéniques permettant de faire exprimer des virus conditionnels au niveau de la moelle épinière est nécessaire. Aucune méthode alternative n'existe pour prévenir l'utilisation d'animaux dans ce protocole : en effet, il est nécessaire de réaliser ces études chez l'animal car l'intégration du toucher et de la douleur implique de nombreux neurones organisés en réseaux complexes et méconnus du système nerveux central et périphérique. Pour chaque animal, nous réaliserons une injection intraspinale d'un seul virus. Les souris injectées avec un virus transynaptique seront analysées post-mortem. Par conséquent, l'euthanasie de l'animal par injection d'une dose létale de pentobarbital est nécessaire. Les souris injectées avec les virus pharmacogénétiques seront analysées à l'aide d'une batterie de tests comportementaux en conditions physiologiques ou dans des modèles de douleur inflammatoires ou neuropathiques. Le nombre de souris par groupe (n=20) est réduit au maximum tout en permettant de discriminer un effet significatif entre les conditions expérimentales et calculé par tests statistiques adaptés. Les groupes testés seront des animaux contrôles ou des animaux douloureux chroniques (soit induit par injection sous-cutanée d'un composé appelé "adjuvant complet de Freund" (CFA) pour les douleurs inflammatoires, soit par écrasement d'une racine nerveuse (constriction nerveuse chronique ou CCI) pour les douleurs neuropathiques). Le modèle inflammatoire CFA, largement utilisé au cours de recherches sur les mécanismes de la douleur, provoque l'apparition d'une hypersensibilité cutanée persistante. De même, le modèle CCI mime la constriction chronique



nerveuse observées chez de nombreux patients neuropathiques atteints de lésions nerveuses et qui est responsable d'une hypersensibilité dans le, et autour du, territoire lésé. L'utilisation d'autres modèles de douleur pourra être envisagé afin d'étendre les résultats de l'étude à différentes conditions pathologiques.

Le nombre de souris expérimentales est de 100 (20 pour le traçage transynaptique antérograde, 20 pour le traçage transynaptique rétrograde et 20 contrôles + 20 douleurs inflammatoires + 20 douleurs neuropathiques pour l'étude comportementale) par lignée transgénique. Pour l'étude comportementale, chaque animal est son propre contrôle (avant versus après activation pharmacogénétique) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés tout en conservant un contrôle et une qualité suffisante à l'expérimentation. Chaque animal sera testé à l'aide d'une série de stimulations mécaniques et thermiques ce qui contribue au respect des "R" réduire et raffiner. Nous utiliserons un nombre équivalent d'animaux mâles et femelles en respect de la règle des trois "R" et des directives sur la Recherche Animale. La mise en place technique du projet nécessitera un nombre de 20 souris afin de s'assurer de l'infection de populations spécifiques de neurones dans la corne dorsale après injection de vecteurs viraux a bien été réalisée. Le nombre total d'animaux pour ce projet est donc de 120 souris adultes par lignée transgénique. Chaque lignée Cre ne présente pas le même taux d'infectivité par les différents virus utilisés. Une mise au point pour chaque lignée Cre est nécessaire. CHAQUE lignée Cre nécessite donc 120 animaux. 5 Lignées seront utilisées soit un total de  $120 \times 5 = 600$  animaux. L'étude correspondant à ce projet porte sur la douleur. Par conséquent, l'utilisation d'antalgiques suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrit. Cependant, en respect de la règle des trois "R", les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Les animaux seront hébergés dans un portoir ventilé, 4-5 souris par cage. Les animaux auront un accès illimité à l'eau et la nourriture pendant toute la durée de l'expérimentation. L'enrichissement social consiste en la présence de congénères par cage et la composition du milieu de la cage a été enrichi avec des tubes en carton et de la ouate pour leur permettre de nidifier. Aucun des modèles de douleurs décrits dans ce projet n'induit de déficit locomoteur sévère pouvant influencer sur les besoins physiologiques de l'animal. De plus, l'expérimentation sera arrêtée si l'animal montre une perte de poids supérieure à 25% suite à un traitement. Enfin, les tests comportementaux à la douleur seront réduits au minimum (fréquence et intensité des tests) et réalisés selon des protocoles expérimentaux établis et acceptés par la communauté scientifique de la Recherche sur la douleur.

**19807** Il est important de vérifier si un candidat-médicament peut induire une hypotension orthostatique, c'est à dire une diminution de la pression artérielle déclenchée par un changement soudain de posture. Cette évaluation est réalisée sur des chiens préalablement instrumentés avec un émetteur de télémétrie permettant de mesurer la pression artérielle chez l'animal vigile.

Au cours de ce projet, les paramètres cardiovasculaires (pression artérielle, fréquence cardiaque et éventuellement électrocardiogramme) sont mesurés lors des changements de posture imposés aux animaux (test d'inclinaison ou « tilt test »).

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 80 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 le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les risques d'un candidat médicament à générer des hypotensions orthostatiques. 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 chien est l'espèce qui est reconnue auprès des autorités réglementaires comme l'espèce non-rongeur pour l'évaluation des effets cardiovasculaires d'un candidat médicament avant le passage chez l'homme. De plus, il s'agit d'une espèce qui s'adapte facilement aux changements de postures imposés (à la différence du porc).

- Réduction : Un nombre minimal et suffisant d'animaux par groupe est utilisé afin d'analyser de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.

- Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- La validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- 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 adapté afin de permettre une bonne récupération des animaux
- la réduction du volume sanguin prélevé grâce à l'amélioration de la sensibilité des méthodes d'analyse
- la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales

**19808** L'accident vasculaire cérébral (AVC) est une pathologie du système neuro-vasculaire qui représente la troisième cause de mortalité, la deuxième cause de démence et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés. Cette pathologie pose un problème majeur dans le domaine de la santé publique. Aujourd'hui le traitement de la phase aiguë de l'AVC ischémique consiste en l'injection d'un agent thrombolytique (Actilyse®, composé actif : activateur tissulaire du plasminogène – tPA) dans la vascularisation afin de restaurer le débit sanguin, et de réduire les séquelles neurologiques. Cependant ce tPA présente un risque pro-neurotoxique qui limite le bénéfice lié à la reperfusion des tissus ischémiés (risque neurotoxique associé au tPA via les récepteurs au N-méthyl-D-Aspartate - NMDAR). En dehors de cette activité, nous savons aujourd'hui que par un autre de ces domaines (kringle 2) le tPA est capable de modifier le comportement de certaines cellules par sa fixation sur les NMDAR. Chose intéressante, ces récepteurs sont présents sur les cellules endothéliales des vaisseaux mais aussi sur certaines cellules du parenchyme cérébral, en particulier sur les neurones.

Le projet consiste à valider dans un premier temps sur un modèle murin d'AVC ischémique, la supériorité de l'optPA (optimized tPA - une forme mutante du tPA ne pouvant pas interagir avec les NMDAR) vs tPA, sur l'efficacité du traitement ainsi que sur la réduction de la mort neuronale par excitotoxicité.

Dans une deuxième partie, nous souhaitons réaliser une étude fine de la signalisation tPA-NMDAR vasculaire dans l'évolution et le traitement des AVC ischémiques chez l'animal par l'utilisation de lignées de souris transgéniques. Chez ces animaux l'expression vasculaire de tPA ou de la sous-unité GluN1 (sur laquelle se fixe le tPA) des NMDAR est annulée. Cela va permettre de réellement regarder l'impact de la signalisation vasculaire tPA-NMDAR en conditions physiologiques et pathologiques (AVC ischémique).

Enfin un dernier axe complémentaire du précédent, consiste cette fois-ci à annuler l'expression générale du tPA dans l'organisme des animaux, et par l'intermédiaire de constructions génétiques venir la rétablir spécifiquement et uniquement dans les vaisseaux. Ainsi l'influence du tPA vasculaire sur le système nerveux central (SNC) en conditions normales et pathologiques pourra être mieux comprise.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner). La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine des pathologies neurovasculaires. L'anatomie

et la physiologie de la circulation cérébrale sont donc parfaitement connues. De plus il y a déjà de nombreuses données sur l'ischémie cérébrale chez la souris, notre projet se situe dans la continuité de ces études. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés pendant tout le projet. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes. Le bien-être des animaux est contrôlé 7j/7 par une personne qualifiée. Les animaux seront anesthésiés durant les procédures chirurgicales. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

En prenant en compte ces recommandations, un total de 560 souris sera utilisé lors de ce projet.

**19809** La réalisation d'études de toxicologie est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain ou vétérinaire ou pour certaines substances chimiques. 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, tolérance locale, toxicologie de la reproduction et du développement et toxicologie juvénile et des études préliminaires (Recherche de dose, pharmacocinétique, pharmacologie) chez le lapin. 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 lapin 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 18230 pour les 5 ans. Ce nombre 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. Le lapin est une des espèces non rongeur, très utilisée pour les études de toxicologie de la reproduction, puisqu'elle présente une grande sensibilité aux malformations, il s'agit également de l'espèce recommandée pour l'évaluation de la toxicité des vaccins. Pour améliorer le bien-être, une maîtrise tout au long de la vie des lapins de bonnes conditions d'environnement et d'entretien sont assurées (alimentation adaptée, contrôle de la température des locaux, surveillance vétérinaire...). Les lapins bénéficient d'un programme d'enrichissement, avec notamment à leur disposition, un rondin végétal, un bâton de bois, une plateforme de repos et un jouet métallique. 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).

**19810** L'hippocampe est une structure cérébrale clé pour la formation de nouvelles mémoires. La région CA2 de l'hippocampe est une région qui est impliquée dans la formation de la mémoire sociale (c'est-à-dire la capacité de reconnaître un congénère), et le codage de l'espace pendant l'immobilité et qui reçoit des afférences directes de plusieurs structures cérébrales. Longtemps ignorée, cette petite région de l'hippocampe est en train d'émerger comme une région distincte de l'hippocampe avec des propriétés et une composition cellulaire unique. De plus, les neurones de la région CA2 sont particulièrement vulnérables lors de l'apparition de maladies psychiatriques comme la schizophrénie et la démence et ceci a été reproduit dans des modèles murins de la pathologie.

Ce projet vise à déterminer les conditions qui activent la région CA2, quelles en sont les conséquences comportementales et quels mécanismes conduisent aux déficits observés dans la pathologie psychiatrique. Seule l'utilisation de modèles murins permet de mimer la physiologie et la pathologie humaine et d'étudier des modifications de marqueurs physiologiques ou des déficits comportementaux (sociaux, cognitifs ou sensoriels). Nous utiliserons 2600 souris pour une durée de cinq ans. Différentes lignées de souris, transgéniques ou non transgéniques seront utilisées dans une combinaison de techniques utilisant la souris *ex vivo* et *in vivo* (électrophysiologie, optogénétique, histologie et étude du comportement) qui ne peuvent être remplacées par des méthodes substitutives. Notre projet met en jeu des procédures chirurgicales, d'administration de substances pharmacologiques et virales avant étude physiologique ou anatomique et une évaluation des fonctions cognitives, émotionnelles et sociales des souris à l'aide de différents tests comportementaux. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons permettant une analyse statistique efficace des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. Pour éviter toute souffrance les procédures de chirurgie et de prélèvement se feront sous anesthésie générale. Les animaux seront observés quotidiennement et évalués à l'aide de points limites bien définis. Ce projet apportera des données importantes sur le fonctionnement de l'hippocampe et son implication dans les réponses cognitives, émotionnelles et sociales qui sont touchées dans les pathologies psychiatriques.

**19811** La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune générant la destruction des cellules bêta à insuline et provoquant une glycémie à jeun  $>1.26\text{g/l}$  de sucre par litre sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans les veines du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, nous avons développé une technique de transplantation dans l'omentum : le hOMING alliant biomatériaux et site d'implantation permettant de diminuer le nombre d'îlots de 25% en maintenant une normoglycémie. Le but de la présente étude est de tester l'impact de matrices/hydrogels (biocompatibles) définis sur la survie du greffon en condition hOMING, et de tester une diminution encore plus importante du nombre d'îlots nécessaires pour reverser le diabète. Pour cela, 6 hydrogels seuls ou fonctionnalisés seront testés et comparés à notre contrôle (HPMC supplémentés en plasma). Dans le cas où la réversion se révélerait meilleure, a quantité d'îlots sera diminuée pour une seconde étude voire une troisième avec un nombre d'îlots moindre. Nous avons choisi le modèle du rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Cette étude sera réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, greffés avec des îlots pancréatiques pour mimer le contexte clinique chez le patient humain. Réduction: Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (440 receveurs rats mâles Lewis pour 1413 donneurs soit 1853 au total). Raffinement: Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que

de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Les rats sont placés dans des cages de 1500cm<sup>2</sup>, en fonction de leur poids (jusqu'à 200g ils sont 6 par cage), entre 200 et 300g ils sont 5 et ensuite un rat est enlevé par tranche de 100g). Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Enfin, des points limites prédictifs et précoces ont été établis permettant de soustraire l'animal à la souffrance. Remplacement: Enfin, l'étude consiste à déterminer l'efficacité de biomatériaux sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique, ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

**19812** L'objectif de notre étude est de proposer un nouvel outil diagnostique peropératoire destiné à aider les neurochirurgiens à cartographier les zones saines et les zones lésées du cortex afin d'orienter les résections de tumeurs ou de tissus à l'origine des crises épileptiques, tout en évitant les séquelles importantes chez les patients. En vue de cette application lors des chirurgies du cerveau chez le patient humain, nous avons développé un prototype capable de refroidir très localement le cortex cérébral, permettant ainsi une localisation très fine des aires sensorielles ou motrices telles que les aires contrôlant la parole ou les mouvements des jambes, en alternative à la stimulation électrique standard.

Malgré notre souci de remplacement des modèles animaux, aucun modèle alternatif ex vivo ne permettant de réaliser les tests fonctionnels nécessaires à l'évaluation de l'efficacité de ce dispositif adapté à la taille humaine, nous aurons recours à un modèle animal de grands mammifères. Pour éviter les incertitudes publiées lors de l'évaluation de certains dispositifs médicaux humains sur des modèles rongeurs de petite taille, nous choisirons le modèle porcin en raison de ses similitudes anatomiques avec l'Homme et de sa taille suffisamment importante pour tester le dispositif développé pour une application clinique. La taille du cerveau du porc et la possibilité d'identification des différentes aires corticales fonctionnelles grâce aux atlas topographiques disponibles nous permettront d'imiter l'environnement chirurgical clinique pour valider cette nouvelle approche d'évaluation peropératoire de la fonctionnalité des tissus cérébraux.

Dans le respect de la règle des 3R, chaque animal sera son propre témoin afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Notre projet prévoit le recours à 5 jeunes porcs charcutiers afin d'assurer la validité des résultats scientifiques escomptés. Pour raffiner notre protocole expérimental, tout au long de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux qui seront hébergés dans des installations adaptées aux besoins de leur espèce et qui bénéficieront d'une surveillance quotidienne afin de nous permettre d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe d'inconfort des animaux. De plus pour éviter toute souffrance lors de notre expérimentation aiguë, les animaux seront anesthésiés et ils bénéficieront aussi d'un traitement antalgique adapté.

**19813** L'épithélium intestinal est un système en constant renouvellement cellulaire à partir de cellules souches. En dépit des progrès importants réalisés au cours de ces dernières années, les mécanismes moléculaires et cellulaires contrôlant la prolifération et la différenciation cellulaire qui sous-tendent ce renouvellement cellulaire sont encore imparfaitement élucidés. L'objectif de ce projet de recherche vise premièrement à étudier le rôle de la machinerie transcriptionnelle de base au cours du développement embryonnaire de l'intestin chez la souris adulte, et deuxièmement sa régulation des différents types cellulaires différenciés de l'intestin.

La réalisation de ce projet devrait apporter des informations originales concernant les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et l'homéostasie intestinale, et leur dérégulation dans les cancers de l'intestin. A terme, la compréhension de ces mécanismes est susceptible de déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de ces cancers. Le projet nécessitera l'emploi de différents modèles transgéniques de souris.

Au total, il est envisagé l'utilisation de 346 souris pour la réalisation du projet sur 5 ans. La règle des 3R sera appliquée pour l'ensemble des souris.

Réduire. Les chiffres indiqués dans le dossier correspondent au nombre maximal d'animaux utilisés pour les expériences envisagées. Sur la base de notre expérience et de la littérature, un nombre d'animaux minimum et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs a été choisi.

Remplacer. Ces expériences ont pour objectif d'étudier les conséquences structurales et fonctionnelles de la perte d'expression de TAF4 ou de Numb sur l'organisme incluant le microenvironnement (fibroblastes, cellules immunitaires, microbiote...). Elles ne peuvent être réalisées que sur des animaux vivants et non sur des cultures cellulaires. Néanmoins, l'utilisation d'organoïdes en culture *ex vivo* dérivés du tissu intestinal d'animaux transgéniques permettra de remplacer les animaux pour les études ne nécessitant pas la prise en compte d'un organisme complet. Raffiner.

Les animaux seront hébergés dans des conditions sanitaires contrôlées et permettant un bien-être optimal (ex. carrés de coton pour la fabrication des nids, balançoires). Les procédures ont été réfléchies afin de réduire au maximum le stress et les souffrances des animaux soumis aux expérimentations. Les animaux seront surveillés très régulièrement durant les procédures. En cas d'apparition de signes de souffrance au cours des protocoles (ex. perte de poids, pelage dégradé, prostration), les animaux seront traités contre la douleur ou les procédures seront arrêtées.

**19814** Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez le rongeur pour des candidats médicaments dont l'administration sera réalisée par perfusion intraveineuse avec implantation de cathéter.

Ces études peuvent avoir plusieurs objectifs :

- évaluation précoce du profil toxicologique du candidat médicament : établir quels sont les organes cibles et les doses toxiques pour un organisme vivant.
- recherche des mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposition des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice risque à utiliser ces médicaments
- détermination du profil pharmacocinétique et sélection des molécules ayant les meilleurs profils parmi une série de molécules, ou comparaison du profil lors d'un changement de formulation ou de sel de la molécule
- comparaison des paramètres pharmacocinétiques de différentes formulations et/ou sels de molécule, pour vérifier la bonne exposition et permettre ainsi d'évaluer l'efficacité et la toxicité dans les études ultérieures,
- ajustement des doses et/ou du schéma expérimental des essais précliniques
- aide à l'interprétation des données pharmacologiques et toxicologiques

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives *in vitro* et *in silico* sont utilisées au préalable dans la caractérisation et la sélection des molécules dans les stades précoces du développement.

L'implantation de cathéter(s) vasculaire(s), réalisée au préalable sous anesthésie (avec tapis chauffant), selon les règles de l'art avec un protocole d'analgésie adapté au cas par cas, permet l'administration unique ou répétée par perfusion intraveineuse (sans contention manuelle de l'animal). L'implantation de cathéter vasculaire peut également permettre des prélèvements sanguins répétés, sans contention manuelle de l'animal.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1 j à 4 semaines, elles incluent des observations cliniques, des prélèvements sanguins pour mesure du taux de médicament dans le sang et ou vérification des paramètres hémato-biochimiques. Les prélèvements sanguins, sont adaptés en terme de volume et de fréquence conformément à la réglementation et réalisés avec les méthodes les moins contraignantes possibles ; par exemple le microsampling. Des collectes d'urine sur des durées inférieures ou égales à 24h peuvent être également effectuées

Le nombre de rongeurs utilisé dans ces études est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés.

Le degré de sévérité de ces études ne doit pas dépasser le stade modéré : des grilles de points-limites sont appliquées, sous contrôle d'un vétérinaire, afin de prendre des décisions rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire et éviter toute souffrance inutile

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement des candidats médicaments en affinant le choix des doses et le schéma expérimental des études ultérieures de sécurité et d'efficacité.

Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation "*in vivo*", un maximum de 720 rats et 280 souris pourra être utilisé sur 5 ans .

**19815** 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.

[AVENANT2] Pour compléter les études de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité, l'étude nécessitera 240 supplémentaires, soit 748 souris au total (268+240+240 souris supplémentaires).

**19816** La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune générant la destruction des cellules  $\beta$  à insuline et provoquant une glycémie à jeun  $>1.26\text{g/l}$  de sucre par litre sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans la veine porte du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Enfin, les traitements immunosuppresseurs mis en place sont à termes toxiques pour le greffon. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, nous étudions la capacité du facteur de pré-implantation (PIF) produit par le fœtus pour se faire accepter de la mère) à moduler l'inflammation et les réactions de rejet dans le site actuellement utilisé en clinique (le foie) et un site alternatif (l'omentum: tissu graisseux abdominal). PIF est une molécule d'intérêt car il a été décrit dans des modèles de transplantation ovarienne chez le babouin comme inducteur de l'immunotolérance et modulateur de réactions inflammatoires.

Ainsi, le but de ce projet est de tester l'impact de PIF sur l'inflammation et sur le rejet d'îlots au cours de la transplantation hépatique et omentale.

Nous avons choisi le modèle du rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Cette étude sera réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, greffés avec des îlots pancréatiques pour mimer le contexte clinique chez le patient humain. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (300 receveurs rats mâles Lewis pour 640 donneurs Lewis et 1670 donneurs Wistar, total 2610 rats; principe de réduction). Raffinement: Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Enfin, des points limites prédictifs et précoces ont été établis permettant de soustraire l'animal à la souffrance. Remplacement: Enfin, l'étude consiste à déterminer l'efficacité de biomatériaux sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique. Ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

**19817** L'ocytocine (OT) est une molécule jouant un rôle clef dans de très nombreuses fonctions physiologiques, comme la régulation de la douleur, de la peur, ou les comportements sociaux, sexuels ou parentaux. Si ses effets généraux sont à présent bien documentés, les circuits et sous-populations neuronales à la base de ces différentes modulations restent encore inconnus. De même, comment les neurones OT sont activés/recrutés au cours de ces différentes situations comportementales est actuellement inconnu. L'une des limitations principales pour la recherche dans ce domaine est technique : comment accéder à ces neurones *in vivo*, alors qu'ils sont situés en profondeur dans le cerveau. Nous proposons, au travers de ce projet de mettre au point cette technologie de pointe afin de pouvoir dans un second temps caractériser les réactions des neurones OT lors de différentes situations comportementales.



Les résultats attendus permettront de développer une technologie de pointe capable d'apporter de nombreuses réponses scientifiques, non seulement dans le domaine de l'OT mais aussi dans tout domaine des neurosciences nécessitant d'enregistrer l'activité de neurones *in vivo*.

Adéquation avec la règle des 3R.

Remplacer : Notre étude porte sur l'analyse de l'activité complexe de réseaux neuronaux qui ne peuvent être pour le moment reproduits *in vitro* ou *in silico* à partir de modèles mathématiques. Il n'est donc pas possible, à ce jour, de remplacer l'usage d'animaux vivants.

Réduire : Bien qu'il s'agisse d'une mise au point qui intègre des difficultés d'ordre technique attendues, le nombre d'animaux (rats et souris) a été réduit au strict nécessaire pour obtenir des résultats exploitables statistiquement.

Raffiner : Les animaux seront hébergés - sauf exception mentionnée - en groupe dans des cages enrichies avec du matériel de nidation (frisures) et des bâtons à ronger leur permettant d'exprimer des comportements spécifiques à leur espèce. Bien que le projet implique une approche invasive visant à implanter par chirurgie un microscope miniaturisé, le maximum sera fait pour réduire stress et douleur tout au long de l'expérience (animaux libre de leurs mouvements, anesthésie, traitements pré et post-opératoire analgésiques, suivi quotidiens de l'état général des animaux). Des points limites spécifiques aux procédures ont été établis ce qui permettra d'interrompre les procédures à tout moment et donc soustraire l'animal à la souffrance.

Nombre total d'animaux utilisés dans ce projet : 454

**19818** Le présent projet vise à caractériser anatomiquement et biomécaniquement la marche bipède chez le babouin olive (*Papio anubis*) en utilisant des méthodes expérimentales non invasives. L'objectif principal est de développer un outil d'aide à la décision (Decision Support System, DSS) pour les anatomistes et paléoanthropologues afin de reconstruire des anatomies plausibles pour les espèces d'hominines fossiles à partir de vestiges fragmentaires et de simuler des marches bipèdes plausibles pour ces espèces compte-tenu de leur anatomie. L'expérimentation proposée ici vise à apporter les données comparatives nécessaires à la validation de ce DSS, par l'analyse fonctionnelle de modèles vivants éloignés morphologiquement de l'homme. La faisabilité technique de l'expérimentation proposée a été validée lors du projet précédent intitulé « Analyse biomécanique non invasive de la marche bipède et de la marche quadrupède du babouin olive instrumenté ». Suite logique, le présent projet a pour objectif de déterminer les fondements anatomiques et moteurs (contrôle moteur) de la marche bipède et de la transition de la quadrupédie à la bipédie dans un échantillon de 5 babouins olive (2 adultes et 3 jeunes), intégrant pour les 3 jeunes un suivi individuel de 4 ans réduisant au maximum le nombre d'individus impliqués dans le projet. Les données anatomiques utilisées dans cette étude seront collectées grâce à une méthode non-invasive (Scanner) permettant de raffiner les procédures.

Remplacement : Il est impossible de remplacer le modèle primate non humain du fait de la nécessité d'obtenir des individus se déplaçant en bipédie.

Réduction : Le nombre d'individus a été réduit au maximum.

Raffinement : Concernant l'acquisition des données cinétiques et cinématiques, les animaux seront entraînés par des techniques de renforcement positif à accepter le positionnement des électrodes de surface (i.e. Electromyographie (EMG) de surface et sans fil et à coopérer à marcher à deux et quatre pattes sur un tapis roulant à vitesse constante sans aucune contrainte. Cet entraînement permettra de raffiner les procédures au maximum. Pendant ces sessions, les mouvements et l'activité musculaire des animaux se déplaçant librement seront enregistrées. Les seuls gestes invasifs effectués sur les animaux au cours de ce projet se résument aux anesthésies (par voie intramusculaire) nécessaires pour 1) l'instrumentation des animaux (positionnement des électrodes en surface + marqueurs rétroéclairés) lors de la marche contrôlée des animaux et 2) la prise d'images lors des scanners. Aucune mesure analgésique n'est prévue lors de l'exécution de ces gestes car aucune douleur est attendue. L'anesthésie est nécessaire pour améliorer la précision de

positionnement des électrodes et des marqueurs, ainsi que pour réduire le stress de l'animal lié à la contention/immobilisation sur plusieurs minutes.

**19819** L'objectif de ce projet est de mettre en évidence, *in vivo*, une activité antihypertensive de fractions ou extraits alimentaires (FEA) et d'identifier le (ou les) composé(s) actif(s), afin de déterminer le mécanisme de l'activité antihypertensive de ces FEA.

Le potentiel FEA, à réduire ou prévenir l'hypertension artérielle ou ses complications, sera étudié chez le rat SHR (rat spontanément hypertendu). Ce modèle animal est un modèle d'hypertension artérielle mimant la pathologie humaine. La pression artérielle systolique chez l'animal vigile sera déterminée par la méthode de sphingomanométrie (ou « tail-cuff method »). Cette technique, non invasive, consiste à placer un brassard obturant au niveau de la queue de l'animal, ainsi qu'un capteur de pouls.

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. En effet, les animaux seront réutilisés lors de 2 à 3 expériences successives lorsque leur pression artérielle sera de nouveau stabilisée à son maximum (200-210 mmHg). L'enrichissement de l'environnement sera effectué à l'aide de bois à ronger (Briques de peuplier pour rats, Safe) et de la litière en quantité suffisante.

Le nombre d'animaux estimé est de 360 rats dont, 270 rats SHR et 90 rats contrôles Wistar Kyoto. Une étude utilisant le même protocole a fait l'objet d'une saisine précédente et ayant reçu un avis favorable pour une période de 5 ans se terminant le 11 juillet 2018. Il s'agit donc du renouvellement d'une procédure précédemment approuvée.

Il n'y a pas de point limite dans la première procédure : Détermination de l'activité anti-hypertensive de fractions ou extraits alimentaires. Cependant, les animaux seront attentivement surveillés. Si des complications ou des signes de détresse de l'animal devaient survenir pour des raisons non liées au protocole, les animaux seraient euthanasiés par inhalation de dioxyde de carbone). Cette procédure expérimentale n'est pas douloureuse. Afin d'obtenir des résultats reproductibles, il sera nécessaire d'entraîner très progressivement les animaux maintenus à l'état vigile à un bref séjour dans un tube de contention. Cette précaution permettra de limiter au maximum le stress des animaux, ce qui est une nécessité absolue pour l'obtention de résultats reproductibles.

En ce qui concerne la deuxième procédure : Prélèvements sanguins veineux. La douleur sera limitée dans cette procédure (douleur légère et de courte durée. Afin d'atténuer la douleur à la queue de l'animal, lors des prélèvements sanguins par voie intraveineuse au niveau de la veine, un anesthésique local de type EMLA sera préalablement appliqué. Le point limite pourra être la survenue d'une infection locale. Afin de limiter le risque d'infection, les zones de prélèvement seront désinfectées avant et après les prélèvements sanguins. Les animaux seront quotidiennement surveillés. Toutefois, si une infection survient associée à des signes de détresse (piloérection, prostration, perte de poids supérieure à 20% de son poids initial etc...), l'animal sera sacrifié (euthanasie par inhalation de CO<sub>2</sub>).

**19820** Le contexte scientifique : La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative caractérisée par des perturbations progressives d'ordre moteur, cognitif, et psychiatrique/comportemental. Cette maladie est la plus fréquente des maladies génétiques affectant le cerveau. Sur le plan des lésions, elle est caractérisée par une dégénérescence neuronale progressive et particulièrement grave du striatum, zone du cerveau impliquée dans le contrôle des mouvements. Il n'y a actuellement aucun moyen de stopper ou d'inverser l'évolution de cette maladie qui est toujours mortelle 10-15 ans après l'apparition des premiers symptômes. Le remplacement des neurones perdus par une greffe de cellules saines remplissant la même fonction (thérapie cellulaire) est actuellement la seule approche qui semble pouvoir ralentir le cours de cette maladie. Les cellules souches pluripotentes humaines (CSPh) sont aujourd'hui considérées comme un matériel biologique de choix pour cette approche de thérapie cellulaire. En effet, les CSP ont

une capacité d'auto-renouvellement illimité et peuvent se différencier dans n'importe lequel des types cellulaires de l'organisme.

Le projet : - Notre projet de recherche propose d'établir, d'abord lors d'expériences précliniques, le potentiel thérapeutique de cellules précurseur de neurones spécifiques du striatum produits à partir de CSPh pour la thérapie cellulaire de la MH. Nous évaluerons également l'impact des mutations causales de la MH sur ces greffons. A l'heure actuelle, nous savons générer des progéniteurs de neurones transplantables et potentiellement fonctionnels à partir de CSPh. De nombreux défis restent encore à résoudre, notamment l'optimisation et/ou la démonstration de la sûreté et de la fonctionnalité *in vivo* des greffons issus de CSPh.

Pourquoi travailler chez l'animal? -

La comparaison entre les résultats du contrôle qualité des greffons striataux *in vitro* et ceux réalisés *in vivo* chez le rat nude lésé au niveau du striatum a mis en évidence l'impossibilité (à ce jour) et sur la seule base de résultats *in vitro*, de prédire de manière fiable la sécurité (taille, surcroissance) et l'identité détaillée des greffons striataux issus de CSPh. Par ailleurs, l'analyse fonctionnelle du greffon, c'est-à-dire la mesure de sa capacité à « réparer » la fonction du striatum de l'hôte ne peut se faire que chez l'animal en l'absence de test *in vitro* pertinent et fiable. Le projet met en œuvre un maximum de tests *in vitro* préalables aux expériences chez le rat ceci conformément avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R). Les tests *in vitro* permettent de qualifier en partie la nature du greffon et sa capacité à produire des types cellulaires d'intérêt. La survie, la prolifération et surtout l'intégration fonctionnelle des neurones du greffon dans les réseaux neuronaux de l'hôte ne sont pas à ce jour modélisable autrement que chez l'animal (e.g le rat).

Nous recourons à un modèle rongeur connu (rats Nude) dont les caractéristiques permettent la survie des greffes de cellules d'une autre espèce (ici humaine/primat) dans le cerveau à long terme. Nous réaliserons expérimentalement la lésion du striatum selon une méthode très bien décrite (par l'acide quinolinique – QA) qui induit rapidement la mort des neurones striataux. Cette perte neuronale mime les pertes striatales observées chez les patients. Les tests comportementaux permettant d'observer les défauts induits par le QA sont connus. La lésion striatum de rat avec du QA n'induit pas de dommages ou douleurs chroniques et ne compromet pas la capacité des animaux à se nourrir. Pour certaines expériences pilotes une lésion plus restreinte mais bilatérale du striatum sera utilisé ceci afin de diminuer par deux le nombre de rat utiliser lors des greffes. Les études comportementales ne peuvent cependant pas être menées sur des animaux transplantés avec deux greffons différents.

Combien de rat pour quels résultats ? Le projet suivra un processus itératif : certaines expériences ne seront commencées que si les précédentes sont validées avec succès. Plusieurs types d'animaux seront suivis et comparés : des animaux sans lésion, des animaux avec lésion du striatum, des animaux avec lésion du striatum et greffés. Le nombre de rats par groupe varie entre 3 (expériences pilotes) et 16 rats (pour les expériences de comportement) ceci afin de s'assurer que les expériences soient interprétables statistiquement. Jusqu'à 457 rats seront utilisés sur une période de 5 ans. Les résultats attendus seront de plusieurs ordre : 1) valider la pertinence thérapeutique de greffons striataux issus de CSPh en établissant la preuve de concept de l'efficacité de ce genre de greffon ; 2) mieux comprendre les déterminants d'une réparation fonctionnelle d'un striatum lésé au QA par des cellules neuronales du greffon ; 3) mieux comprendre l'impact de la mutation causale de la maladie de Huntington dans les dysfonctions du striatum chez les patients.

Les protocoles de chirurgies stéréotaxiques prévus ont été mis au point de façon à réduire au maximum la douleur (sous anesthésie générale et utilisation systématique d'analgésiques per et post-opératoires), et le stress induit par cette étude (suivi journalier par les zootechniciens et hebdomadaire par les expérimentateurs). En outre, le bien-être des animaux reposera sur la présence d'accessoires d'enrichissement de leur milieu de vie. Leur suivi sera assuré quotidiennement.

**19821** Le modèle murin d'ischémie cérébrale est largement utilisé en recherche préclinique afin de tester des traitements pouvant diminuer la taille de la zone atteinte du cerveau et par conséquent de limiter les dommages cognitifs et moteurs. L'objectif de la présente étude est de calculer la taille de la zone à risque (= zone hypo-perfusée) du cerveau suite à une occlusion artérielle à l'aide d'un nouvel appareil d'imagerie puissant et non invasif. Deux types d'ischémie seront étudiées : permanente ou transitoire afin d'identifier une possible corrélation entre la taille de la zone à risque visible en imagerie et la taille de la zone nécrosée accessible en post-mortem. Cette étude est prévue pour une durée approximative d'un an et à terme permettra de valider ou non l'intérêt de ce nouvel appareil d'imagerie dans la thématique de recherche sur la protection des tissus suite à un accident vasculaire cérébral de type ischémique. Par la suite, de prochaines études pourront porter sur l'effet de nouveaux traitements sur la taille de la zone nécrosée rapportée à la taille de la zone à risque. Les animaux seront anesthésiés et opérés par des personnes compétentes et qualifiées pour occlure de façon transitoire ou permanente une artère irriguant le cerveau. Les souris seront ensuite échographiées par des personnes formées à l'appareil et aidées par une experte échographiste afin de visualiser les flux sanguins et de mesurer la taille de la zone à risque grâce à différents types d'imagerie (B-mode, doppler color, imagerie de contraste). La zone à risque pourra être étudiée après injection en veine caudale (non invasif) d'un produit de contraste adapté à l'animal. Cette étude doit obligatoirement être réalisée sur animaux vivants étant donné que c'est la perfusion de l'organe qui est étudiée. L'espèce utilisée sera la souris du fait que l'appareil et les sondes échographiques associées sont prévues pour cet animal et que le modèle d'ischémie est maîtrisé sur cette espèce. Au total 9 animaux [modification du 23-09-21] seront étudiés. Les souris de la pré-étude seront étroitement observées pour raffiner au mieux les paramètres d'une fiche de suivi post-opératoire et les points limites. Pour chacun des deux groupes expérimentaux, le nombre minimal et suffisant d'animaux pour pouvoir répondre à notre question a été estimé grâce à une pré-étude sur l'appareil d'échographie et en tenant compte de la mortalité liée à l'intervention chirurgicale. Les souris recevront des doses d'anesthésiques et d'analgésiques adaptées tout au long de l'étude afin de limiter au maximum la douleur. L'ischémie cérébrale peut entraîner des déficits neurologiques pouvant impliquer une diminution des capacités locomotrices de l'animal. C'est pourquoi les animaux feront l'objet d'un suivi renforcé après l'opération en s'appuyant sur une fiche d'observation permettant de mettre en évidence un éventuel point limite et d'agir en conséquence avec l'avis du vétérinaire référent. Un certain nombre de mesures seront prises afin de limiter au maximum la souffrance et la douleur de l'animal tout au long de la procédure. Un anesthésique local sous forme de crème sera appliqué sur la queue de l'animal pour limiter la douleur liée à la pose du cathéter. De plus, au réveil l'animal sera hydraté et placé dans une couveuse chauffée avec un air enrichi en oxygène et aliment gélifié pour faciliter la prise alimentaire.

**19822** Ce projet constitue une étude préclinique d'un programme de développement d'un nouveau traitement ciblant une maladie neurologique.

Dans ce projet, nous souhaitons tester les effets bénéfiques d'une thérapie génique sur des animaux génétiquement modifiés. Ces animaux sont un modèle animal du syndrome de l'X fragile. Le syndrome de l'X fragile (FXS) est une maladie génétique rare associée à un déficit intellectuel léger à sévère qui peut être associé à des troubles du comportement et à des signes physiques caractéristiques.

L'approche thérapeutique consiste à utiliser un virus modifié en utilisant les capacités d'intégration de celui-ci, sans effet délétère. Deux virus-vecteurs ayant des capacités différentes en terme de propagation et de ciblage des tissus seront testés. Le but de ce projet sera de mettre en évidence les améliorations des problèmes comportementaux observés sur ces animaux mutants.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons donc cibler les neurones affectés par ce syndrome, mais une seconde difficulté s'impose, liée à l'âge. Nous devons en effet travailler avec des animaux particulièrement jeunes, puisque les injections devront être effectuées sur des animaux âgés de 23 jours ne présentant pas encore de symptômes marqués. Cette contrainte est liée au décours de la pathologie se développant dans les modèles animaux qui seront utilisés.

Le projet consistera à injecter les vecteurs viraux par les différentes voies d'administrations (intra-veineuse, intra-cérébrale) et à déterminer leurs capacités à améliorer les symptômes observés à court (une semaine après traitement) et moyen terme (5 semaines après traitement).

Deux sous-projets seront mis en place:

1) Effet thérapeutique à 4 semaine d'âge : 24 animaux contrôles non traités seront comparés à 24 animaux mutés non traités et 24 animaux mutés recevant le traitement. Les deux traitements emploieront ce schéma expérimental portant le nombre d'animaux à 144 souris. Il s'agit du premier âge auquel nous pouvons analyser le comportement des animaux. Le nombre élevé d'animaux par groupe est lié à la faible amplitude des symptômes observés à cet âge ainsi qu'à leur variabilité entre animaux. Nous avons besoin d'un plus grand nombre d'animaux pour augmenter notre puissance statistique.

2) Effet thérapeutique à 8 semaine d'âge : 12 animaux contrôles non traités seront comparés à 12 animaux mutés non traités et 12 animaux mutés recevant le traitement. Les deux traitements emploieront ce schéma expérimental portant le nombre d'animaux à 72 souris. A cet âge, les animaux présentent de manière assez homogène des troubles moteurs importants, cette information nous permet de réduire le nombre d'animaux par groupe (REDUCTION).

Un total de 216 souris pour le protocole sera utilisé durant ces deux sous-projets. Seuls des mâles seront utilisés dans ce protocole, étant donné que cette pathologie est liée au sexe.

Par ailleurs, afin de valider l'effet de notre traitement, lorsque nous aurons obtenu les résultats attendus; nous effectuerons une expérience de validation sur des animaux normaux, requérant 24 animaux avec ou sans traitement.

Le total d'animaux est donc de 240 souris.

Les analyses comportementales effectuées à 4 ou 8 semaines d'âge permettront de mettre en évidence les troubles moteurs et cognitifs des animaux. Elles emploieront des tests dans lesquels le modèle animal de cette pathologie a déjà été caractérisé avec des effets significatifs.

**RAFFINEMENT** : Les animaux bénéficieront d'un enrichissement de leur milieu. Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux avec un recours à l'analgésie et/ou l'anesthésie ainsi qu'à des temps de récupération entre chaque procédure permettant d'éviter un effet cumulatif.

**REMPLACEMENT** : L'utilisation d'un modèle animal est encore obligatoire pour ce type de développement, en effet il n'existe pas à l'heure actuelle d'alternative permettant de déterminer les effets de virus à visée thérapeutiques dans des organismes complexes, notamment en terme de propagation et d'expression.

**19823** Les enfants porteurs de mutations inactivatrices de gènes de la famille Usher naissent sourds et sont progressivement atteints de cécité à l'adolescence (syndrome Usher). En effet, ces gènes sont importants pour le développement des tissus sensoriels de l'oreille moyenne et de l'œil. Une mutation équivalente chez la souris, entraîne la surdité des souriceaux mais ils ne deviennent pas aveugles, la structure rétinienne étant différente dans cette espèce. Le développement d'un modèle animal reproduisant tous les symptômes du syndrome Usher est important pour comprendre les mécanismes d'apparition de la cécité suite à la mutation et pour mettre au point des méthodologies de thérapie génique permettant de contrer l'effet de la mutation sur la vision. Aujourd'hui, l'utilisation d'outils moléculaires performants permet de créer des délétions mimant des mutations naturelles de manière précise et efficace. Cette technologie sera utilisée pour réaliser l'inactivation des gènes Usher 1 (harmonine) et 2 (Myosine 8) chez le porc. Afin de minimiser le nombre d'animaux à utiliser pour générer les lignées mutées, ces séquences sont d'abord testées sur cellules porcines en culture (Réduire). Les séquences les plus efficaces (Raffiner) seront ensuite testées sur des embryons produits *in vitro* à partir d'ovocytes collectés sur des ovaires d'abattoir (Remplacer). Chaque essai comportera 7 donneuses (Large White) d'embryons au stade une cellule et trois receveuses (Meishan) d'embryons mutés (10 animaux). Pour chaque gène, nous envisageons un

maximum de trois séries par gène (30 animaux par gène, soit un total de 60 animaux). Cependant, étant donné des outils moléculaires utilisés, nous espérons qu'une série par gène sera suffisante (total de 20 animaux) pour générer les fondateurs des deux lignées. Des embryons traités surnuméraires seront cultivés *in vitro* jusqu'au stade de blastocyste afin d'évaluer par PCR le taux de mutations induites. Le taux de mutation et le taux de gestation permettront de décider si une autre série doit être lancée ou non (Réduire). Les chirurgies (transfert d'embryons) seront réalisées sous anesthésie gazeuse accompagnée d'une anesthésie locale et d'un traitement antibiotique et analgésique préventifs. Si des signes de douleurs apparaissent par la suite (Point limite : perte d'appétit, isolement, voussure...), la femelle sera euthanasiée et autopsiée pour identifier la cause du problème et l'état des fœtus. Les porcelets seront génotypés à la naissance grâce au fragment d'oreille prélevé lors de la pose des boucles auriculaires réglementaires (Raffiner). Les fondateurs seront croisés et élevés afin d'obtenir une lignée mutée homozygote pour chaque gène. Les animaux seront hébergés dans des loges sur caillebotis équipés de chaînes et balles (jouets, Raffiner) avec accès à l'eau ad libitum et nourriture matin et soir.

**19824** Le microbiote intestinal ou flore intestinale représente l'ensemble des microorganismes de l'intestin et joue un rôle crucial dans la réponse immunitaire. En effet, les changements dans la composition de cette flore intestinale et les modifications du bon fonctionnement du tube digestif (qui influence le transfert des composants de la flore depuis le tube digestif vers le sang) influencent fortement la réponse immunitaire pendant les périodes de stress. L'impact de la flore intestinale sur les réponses immunitaires de l'hôte ne se limite pas au compartiment intestinal mais s'étend au compartiment sanguin et aux muqueuses, comme les poumons. En effet, la flore intestinale peut agir à distance sur les mécanismes de défense de l'hôte pour contrôler les infections respiratoires.

L'infection par le virus de la grippe est caractérisée par une phase pro-inflammatoire (pouvant évoluer vers une pneumonie) puis un processus de guérison. Bien que la phase de guérison soit initiée pour restaurer les fonctions pulmonaires, celle-ci conduit aussi à un état d'immunosuppression favorisant les infections bactériennes secondaires. Comprendre les mécanismes responsables de la surinfection bactérienne suite à l'infection grippale est indispensable pour proposer à terme des solutions thérapeutiques.

Il a déjà été montré que l'infection grippale chez la souris est associée à la disparition ou la dysfonction de nombreuses cellules immunitaires dans le poumon. Nous postulons que pendant la grippe, les changements dans la composition de la flore intestinale, pourraient contribuer à ce phénomène. Cette hypothèse se base sur des données générées chez la souris.

Le primate non humain (PNH) est un excellent modèle pour étudier les conséquences physiopathologiques de la grippe. Seul ce modèle permet de reconstituer les interactions entre un pathogène et son hôte et notamment son système immunitaire. La physiologie (dont la composition du microbiote) et le système immunitaire du macaque sont proches de ceux de l'Homme et caractérisés. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour.

Notre objectif est d'étudier l'impact d'une infection par le virus de la grippe dans ce modèle expérimental, notamment son influence sur le microbiote, et d'exploiter nos connaissances pour proposer de nouvelles options thérapeutiques. Ce projet prévoit d'utiliser au maximum de 44 PNH, nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Leur nombre dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie sont mis en place lors des méthodes expérimentales (prélèvements de sang, prélèvements de fluides et de biopsies, infection expérimentale par voie orale, limitation des volumes de sang prélevés), toutes conçues de façon à éviter les souffrances lors des interventions sur les animaux. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection et en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales pendant la phase d'infection (l'état fébrile des animaux n'excédant pas deux semaines après l'infection). Cet hébergement individuel est nécessaire pour maîtriser les éventuelles surexpositions virales et les contaminations croisées entre individus. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels

effets inattendus (évolution de la maladie). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre les soins appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du «bien-être animal» de l'établissement.

**19825** L'épilepsie du lobe temporal (TLE) est la forme la plus fréquente et la plus grave chez l'adulte. Elle représente les deux tiers des épilepsies partielles, chez les adolescents et les adultes. Le foyer principal des crises épileptiques dans la TLE se localise dans l'hippocampe. Dans ce noyau cérébral, les crises sont l'expression d'un fonctionnement anormal, aigu et transitoire de l'activité électrique des neurones appelés cellules granulaires du Gyrus Dentelé. La suractivité synchronisée de ces neurones résulte de la formation de connexions (synapses) excitatrices récurrentes aberrantes, formant ainsi une boucle d'excitation sur ces cellules elles-mêmes. Le récepteur GluK2 (récepteur kainate au glutamate composé de la sous-unité GluK2) est anormalement exprimé, dans ces neurones, au niveau des synapses aberrantes. Chez les souris transgéniques n'exprimant pas le récepteur GluK2, la fréquence et l'amplitude des crises d'épilepsie induites chimiquement sont très significativement diminuées voire totalement supprimées.

Bien qu'il existe des traitements pharmaco-chimiques de l'épilepsie, 40% des patients atteints de TLE sont réfractaires aux pharmacothérapies actuellement disponibles. Pour ces patients, l'ultime traitement est l'ablation chirurgicale de la zone cérébrale épileptique : l'hippocampe. Comme alternative à la chirurgie, notre projet propose une stratégie de thérapie génique visant à réduire le nombre des récepteurs GluK2 par interférence ARN. Les ARN interférents ciblant les récepteurs GluK2 seront apportés par des vecteurs viraux communément utilisés en thérapie génique humaine.

Ce projet préclinique a pour but la validation *in vivo* chez la souris des outils de thérapie génique que nous avons développés et validés *in vitro*. Ces outils viraux seront injectés *in vivo* par stéréotaxie, dans l'hippocampe de souris sauvage. L'efficacité et la fonctionnalité des outils seront évaluées par des analyses électro-physiologiques, histologiques et biochimiques ; l'éventuelle toxicité des ARN interférents sera également évaluée. Nous optimiserons également la forme de délivrance des ARN interférents. Dans le but d'un traitement de thérapie génique, il est préférable d'envisager une formulation injectable par voie intraveineuse que par stéréotaxie dans le cerveau des patients. Nous souhaitons donc développer un vecteur viral permettant une infection massive et restreinte aux cellules granulaires du Gyrus Dentelé de l'hippocampe, après injection intraveineuse.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de remplacer, le choix et la validation des ARN interférents ont été réalisés sur des modèles *in vitro*. Maintenant, cette étude préclinique nécessite le recours au modèle animal pour évaluer la délivrance des ARN interférents *in vivo*. Pour le R de réduire, nous limitons les groupes expérimentaux au minimum nécessaire pour réaliser des analyses statistiques robustes, soit 10 animaux maximum par groupe. Pour le R de raffiner, toutes les procédures seront réalisées par une personne formée et ont été optimisées pour soulager le stress et la douleur des animaux tout au long de cette étude. Ainsi la chirurgie stéréotaxique 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 en post-chirurgie. 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 sera utilisé pour permettre aux animaux de se cacher et d'établir des liens sociaux entre eux.

Ainsi, ce projet préclinique nécessite l'utilisation au total de 323 souris sur 3 ans : 176 souris seront utilisées pour l'optimisation du vecteur viral de délivrance et 147 souris seront utilisées pour la validation *in vivo*. Si cela est possible, le nombre d'animaux sera revu à la baisse, en cours d'expérimentation.

**19826** La dépression est aujourd'hui la maladie psychiatrique la plus répandue avec une prévalence de 6 à 10% en Europe, mais son traitement reste encore largement insatisfaisant pour une part importante de patients qui ne répondent pas ou peu aux traitements pharmacologiques classiques (antidépresseurs). Elle représente en ce sens un problème majeur de santé publique. En dépit de cette fréquence élevée et du coût économique de sa prise en charge, la compréhension des mécanismes impliqués dans la physiopathologie de la dépression et dans la résistance aux traitements antidépresseurs reste encore limitée à ce jour. De nombreuses données, obtenues notamment dans notre laboratoire, montrent que la composante inflammatoire et immunitaire est impliquée dans le développement des symptômes dépressifs ainsi que dans la résistance aux traitements. L'étude de la voie neuro-immunitaire semble donc un candidat de choix pour le développement de nouveaux traitements alternatifs à la pathologie dépressive.

Les objectifs de cette étude seront d'évaluer le rôle de l'inflammation dans le développement de troubles de type dépressifs chez la souris, ainsi que les mécanismes impliqués dans la résistance aux traitements antidépresseurs. Plus précisément, nous étudierons l'impact de l'inflammation sur le fonctionnement des systèmes de neurotransmission monoaminergique (dopamine, sérotonine), cibles des antidépresseurs classiquement utilisés aujourd'hui. Pour cela, nous utiliserons un modèle d'inflammation induite par un agent bactérien (LPS, lipopolysaccharide) en traitement aigue, induisant une réponse inflammatoire massive et transitoire et s'accompagnant de symptômes de type dépressif tardifs chez le rongeur. Les animaux seront caractérisés sur le plan comportemental (évaluation de l'état émotionnel, anxieux, dépressif, cognitif), biochimique (dosages périphériques et centraux d'hormones, de facteurs pro- ou anti-inflammatoires) et neurochimique (dosage de neurotransmetteurs, activité de synthèse et de dégradation). L'effet de la modulation pharmacologique de ces systèmes monoaminergiques (antidépresseurs, cofacteur enzymatique BH4), sera également évalué sur les mêmes paramètres comportementaux, biochimiques et neurochimiques.

Les expérimentations décrites dans ce projet seront conduites dans le plus strict respect des règles et lois éthiques en vigueur. Cette étude nécessite l'utilisation d'animaux car il n'existe pas de méthode alternative à l'étude des symptômes dépressifs associés à l'inflammation et aux mécanismes neurochimiques impliqués. La mise en œuvre de ces approches complémentaires chez un même animal permettra d'établir des corrélations multiples et des résultats à une échelle intégrée, qui ne peuvent être obtenues sur des cultures cellulaires, dans des modèles computationnels ou encore chez l'Homme (Remplacer). Le recours à des modèles animaux adaptés à l'étude des troubles de l'humeur reste une nécessité expérimentale. La solidité de nos hypothèses de travail en utilisant des groupes expérimentaux de 12 animaux pour assurer la fiabilité statistique, et la qualité de la mise en œuvre des procédures, basée sur l'expertise des expérimentateurs, permettront de contrôler au plus juste le nombre d'animaux utilisés (Réduire). Toutes les précautions possibles seront prises afin de raffiner nos procédures et réduire au mieux la douleur (anesthésie, utilisation d'antalgique lors des chirurgies) et l'inconfort (manipulation régulière et enrichissement de l'hébergement) des animaux (Raffiner).

Ce projet de 3 ans sera réalisé sur 228 souris mâles adultes.

**19827** La trisomie 21 (T21), aussi appelée Syndrome de Down (SD), est due à la présence d'un chromosome 21 surnuméraire. Elle touche 1 nouveau-né pour 600-800 naissances et représente environ un tiers des déficiences intellectuelles chez les enfants d'âge scolaire. En plus d'un faciès caractéristique, les personnes atteintes du SD ont des difficultés d'apprentissage et de mémorisation provenant de défauts dans le développement et le fonctionnement du cerveau. 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 d'un traitement thérapeutique. Les études d'effet de doses de ce gène chez la souris ont démontré son implication dans le développement crânio-faciales et le développement et la maturation post natale du cerveau. En effet, les souris ayant une copie supplémentaire de ce gène d'intérêt présentent des malformations crânio-faciales ainsi qu'un retard



de développement du cerveau entraînant une altération des capacités d'apprentissage et un déficit de la mémoire. Néanmoins, les études des déficiences intellectuelles restent assez limitées chez la souris. Le rat est un meilleur modèle pour l'analyse comportemental mais son utilisation pour l'étude du SD n'a pas été possible car cette espèce n'était pas manipulable génétiquement. Grâce au développement de nouveaux outils génétiques, nous avons pu créer un nouveau modèle de rat ayant trois copies du gène d'intérêt.

L'utilisation du rat dans cette étude est justifiée par le fait que les anomalies à observer (déficits cognitifs et anomalies crânio-faciales) nécessitent un modèle vivant et suffisamment proche de l'homme pour pouvoir être transposées à l'espèce humaine (REMPACEMENT).

Dans ce projet, nous analyserons ce nouveau modèle dans des tâches comportementales pour lesquelles un déficit a déjà été observé chez les souris trisomiques pour ce gène (apprentissage, mémoire et activité circadienne), afin de valider ce modèle pour le SD. Ces tests concerneront le comportement exploratoire dans un nouvel environnement, différents types de mémoire et le rythme circadien. Par la suite, nous souhaitons étudier la structure de la rétine afin de confirmer le rôle de ce gène dans l'épaississement rétinien observé chez les patients atteints du SD.

#### RAFFINEMENT:

L'ensemble des tests comportementaux et d'imagerie de la rétine entraîne très peu de stress ou souffrance pour les animaux. De plus, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien permettant de s'assurer de leur bien-être et de leur santé. Les animaux présentant des signes de douleur seront exclus des analyses et soignés ou euthanasiés selon leur état.

#### REDUCTION:

Pour ces tests, des rats mâles seront utilisés, sexe référent de l'étude chez la souris, à partir de 8-10 semaines, âge équivalent au jeune adulte chez le rat. Afin de minimiser le nombre de rats utilisés, tous les tests comportementaux et l'imagerie de la rétine seront réalisés avec les mêmes animaux. Les femelles produites seront euthanasiées et utilisées pour l'analyse crânio-faciale. Comme cette analyse ne fait pas l'objet d'une procédure expérimentale, le nombre de rats utilisés ne tient pas compte des femelles.

Les tests statistiques utilisés seront soit le test de Student pour des groupes non appariés avec comparaison de moyennes entre 2 groupes à une constante spécifiée, ici 50% correspondant à une performance au hasard, soit le test d'ANOVA 2 entrées. Entre 12 à 16 animaux par groupe sont nécessaires pour avoir une puissance statistique suffisante permettant de déterminer si une différence existe entre les deux groupes. Cette étude nécessitera un total de 64 rats au total (32 mâles pour le comportement et 32 pour l'analyse de la rétine avec 16 animaux par génotype à chaque fois).

**19828** Contexte : les gammes de foie gras de canards produits en France correspondent à un large éventail de présentations à disposition du consommateur. Ils sont soit commercialisés crus ou transformés à l'échelle industrielle ou artisanale. Ces derniers sont souvent stabilisés par traitement thermique (appertisation, pasteurisation).

Le foie de palmipèdes (canard, oie) accroît sa concentration lipidique au cours du gavage des animaux : les lipides représentent 2 à 5% du poids de foie de l'animal prêt-à-gaver et 55 à 60% du poids de foie en fin d'engraissement. Lors du traitement thermique, une partie des lipides accumulés dans le foie peut migrer de la structure cellulaire vers la surface du foie : il s'agit du phénomène de fonte. Les foies gras de canard peuvent avoir des taux de fonte très variables : de moins de 5% à plus de 50 %. La variation du taux de fonte est importante et s'élève à 25%. De nombreux facteurs peuvent l'influencer comme par exemple le poids des foies, l'intensité de gavage, la durée de jeûne avant l'abattage, le traitement post-mortem des foies, ...

En abattage et transformation industrielle, les foies gras crus sont orientés vers différents modes de transformation en fonction de leur fonte présumée. Celle-ci est estimée uniquement à partir de leur poids individuel. De ce fait seul un tri sur leur poids est effectué. Ce tri pondéral est connu pour être peu performant seul car insuffisant pour opérer un classement prédictif de la fonte lors du

traitement thermique. Les industriels de la filière souhaiteraient pouvoir disposer d'outils complémentaires, sous la forme de mesures physiques prédictives du taux de fonte non destructives, rapides et objectives permettant d'assister les opérateurs dans l'opération de tri des foies post abattage.

Objectif : les objectifs du projet sont la mise au point d'outils de mesures physiques rapides non destructives pouvant contribuer à classer les foies gras crus post abattage, en proposant une prédiction du comportement technologique lors d'un traitement thermique, c'est-à-dire une estimation du taux de fonte prévisionnel. Différentes techniques seront utilisées comme la spectroscopie Infra-Rouge ou l'imagerie hyperspectrale, technologies permettant d'analyser la composition chimique des produits. Ces mesures seront réalisées post mortem sur les foies gras par des chercheurs appartenant à différentes instances de recherche disposant du matériel et des connaissances adéquates à leur utilisation.

Le projet consiste à la réalisation, en station expérimentale, d'une étude plus approfondie qu'une précédente réalisée en 2018 par le porteur de projet (cette première étude avait consisté à évaluer la faisabilité et la pertinence des mesures sur foies crus issus de sites industriels d'abattage et de transformation en relation avec leur taux de fonte). Il s'agirait donc de mettre en corrélation ces mesures physiques avec le taux de fonte. La station expérimentale permettrait de mettre en œuvre différentes modalités expérimentales et de minimiser au maximum les facteurs agissant sur le taux de fonte (durée post mortem, cinétique de refroidissement des foies, ...).

Le protocole proposé a pour objectif d'obtenir des foies gras de poids variés obtenus par un de gavage d'intensité différente. Deux gammes de poids sont considérées : des foies gras dits « légers » de poids compris entre 450 et 550 g et des foies gras dits « gros » de poids compris entre 550 et 650 g. Le poids de foie dépend de l'ingéré alimentaire en gavage.

Afin de répondre aux objectifs, 2 modalités de gavage sont envisagées : des canards recevront une quantité de nourriture supérieure à celle reçue par d'autres (10 gr de plus en début de gavage et 20 gr en fin de gavage). Cette différenciation de l'alimentation constituera 2 courbes de gavage, l'une dite modérée, l'autre dite soutenue.

200 canards sont considérés dans ce projet et seront mis en élevage en 2 lots (n=100/lot) espacés de 20 jours de façon à obtenir un nombre d'individus suffisant pour pouvoir établir une corrélation statistique robuste entre les mesures et le taux de fonte (lot 1) puis de la vérifier à l'aide d'un second lot indépendant mais similaire en termes de techniques d'élevage, de gavage et d'abattage.

Les animaux seront élevés conventionnellement selon les modalités d'élevage des canards IGP (Identité Géographique Protégée ; accès sur parcours herbeux, bâtiment d'élevage de type Louisiane (présence de volets latéraux permettant de réguler la luminosité et l'ambiance), aliment commercial, abreuvement linéaire permettant de tremper la tête) jusqu'à l'âge de 85 jours. Ils seront ensuite mis en gavage au sein de la salle de gavage de la station et recevront 21 repas à raison de 2 par jour, un seul repas étant distribué le premier jour.

Pour chaque lot, 2 mises en gavage de 50 canards chacune, espacées d'un jour sont prévues afin d'échelonner les abattages sur 2 jours du fait du temps de réalisation nécessaire aux mesures post-mortem pratiquées sur les foies gras. Les 2 courbes de gavage seront appliquées à 50 canards de chaque lot.

En fin de gavage, les canards seront mis à mort dans l'abattoir agréé de la station par électronarcose suivi d'une saignée. Après plumaison, ils seront éviscérés et le foie sera prélevé pour la réalisation des mesures physiques non destructives. Les carcasses sont récupérées pour transformation et commercialisation.

1) Remplacer: Etudiant les facteurs agissant sur les caractéristiques du foie des canards, ce projet ne peut s'entreprendre que chez l'animal vivant et ne peut en aucun cas être remplacé par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

2) Réduire : l'utilisation de 200 canards est le nombre minimal permettant d'assurer des tests statistiques robustes

3) Raffiner: les animaux seront hébergés dans des conditions compatibles avec la biologie de leur espèce. Une observation biquotidienne des animaux sera ainsi réalisée tout au long de l'élevage et du gavage. En cas d'atteinte au bien-être des animaux un suivi sera assuré et des mesures seront prises si nécessaires (modification des conditions d'ambiance, retrait de l'expérimentation, euthanasie). Si nécessaire, le vétérinaire sera consulté et déterminera la conduite à tenir dont l'éventuelle interruption de l'expérimentation.

**19829** Nous avons centré le présent projet sur les neurones cholinergiques des ganglions de la base (striatum) et du noyau basal de Meynert (NBM) car ces deux populations sont atteintes dans la maladie de Parkinson. Dans ces deux noyaux les neurones cholinergiques peuvent être séparés en deux sous populations, ceux qui ont pour co-neurotransmetteur le GABA (CGINs) et ceux qui ne l'ont pas (CINs). Afin de mieux cerner les différences entre CINs et CGINs, notre projet est d'identifier au cours du développement embryonnaire et postnatal en conditions physiologiques puis en condition pathologique, si :

1. Leur distribution est homogène dans le striatum et le NBM
2. Leurs propriétés intrinsèques morphologiques et électrophysiologiques diffèrent
3. La proportion de CGINs versus CINs varie
4. Leurs rôles dans les microcircuits du striatum ou du NBM diffèrent
5. La corrélation de ces différentes données avec l'acquisition ou la perte de comportements moteurs

Il s'agit d'une recherche fondamentale dont nous estimons la durée à quatre années. Le modèle animal sur lequel nous travaillons est le modèle souris. Nous travaillons *in vivo* pour le comportement et *in vitro* sur des tranches de cerveau, de souris soit témoins soit traitées ou opérées. Pour fabriquer un modèle souris de la maladie de Parkinson, nous injectons directement dans le cerveau de souris adultes une toxine qui fait dégénérer uniquement les neurones à dopamine.

Pour cette recherche nous appliquons la règle des 3R quand cela est possible : remplacement, réduction, raffinement.

Remplacement : Pour étudier des processus de développement cérébral que nous savons contrôlés par de nombreux facteurs présents dans le cerveau entier (la genèse de neurones, la formation de réseaux de neurones, l'activité de ces réseaux) et sur des processus qui apparaissent lors de la maladie de Parkinson (dysfonctionnement des réseaux), nous devons travailler sur des mammifères. Nous ne pouvons travailler sur des lignées neuronales en culture ni sur des modèles théoriques qui ne peuvent exister sans savoir quoi modéliser.

Réduction : Nous ferons des expériences sur 36 souris femelles gestantes, 491 souris et souriceaux mâles et femelles soit un total de 527 souris. Afin de réduire au minimum ce nombre, c'est-à-dire de ne pas faire d'expériences inutiles ou en doublons, nous avons planifié nos expériences pour étudier le plus de critères possibles sur les mêmes cerveaux et nous analyserons nos résultats au fur et à mesure. Nous avons aussi calculé ce nombre d'animaux pour avoir des résultats statistiquement valides c'est-à-dire obtenus sur des échantillons qui ne soient ni trop petits ni inutilement trop grands.

Raffinement : Nous ferons très attention à la douleur des souris et à leur stress. Pour éviter la douleur lors des gavages, nous employons une canule à bout rond afin d'éviter toute blessure. L'utilisation de l'huile de maïs pour dissoudre la substance injectée permettra l'introduction aisée de la canule dans l'œsophage. Le volume introduit sera calculé pour ne pas causer de douleur par distension de l'estomac. Après gavage, les femelles gestantes seront hébergées en cages individuelles équipées, en plus de l'enrichissement de base, de matériaux de nidification, pour leur permettre de récupérer et de se préparer à la mise-bas. Pour éviter la douleur lors de la chirurgie (incision de la peau du crâne et percement de deux petits trous dans la boîte crânienne), nous anesthésierons et analgésierons profondément les souris et contrôlerons leur température, respiration et calme pendant toute la chirurgie. Avant leur réveil nous leur donnerons une dose

d'analgésique pour qu'elles ne souffrent pas. Après leur réveil et jusqu'à leur mise à mort pour le prélèvement des cerveaux, nous les observerons quotidiennement pour repérer les signes de souffrance (mesure poids, aspect et comportement). Pour éviter le stress, avant et pendant les expériences, les souris seront hébergées dans des cages standards enrichies (dôme-home ou nids-végétal dans les cages), et dans un environnement avec température, hygrométrie et lumière contrôlées (cycles 12 heures jour/ 12 heures nuit). Les animaux auront un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau.

**19830** La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative efficace à l'insulinothérapie chez les diabétiques de type 1, mais limitée par le manque de donneurs et le recours aux immunosuppresseurs. C'est pourquoi, nous avons développé un dispositif d'encapsulation de cellules sécrétrices d'insuline, imperméable aux molécules impliquées dans le rejet mais perméable au glucose, à l'insuline, aux nutriments. Ainsi, aucune immunosuppression n'est nécessaire et des sources alternatives de cellules seraient utilisables.

Il a précédemment été démontré que les membranes actuelles empêchent le rejet des cellules injectées dans le dispositif par le receveur. Cependant, aucune étude n'a été réalisée, pour relier la taille de pore des membranes et leur capacité à protéger les cellules du rejet. Le but est donc ici de déterminer le lien entre ces deux paramètres, afin de déterminer la plus grande taille de pore des membranes permettant d'empêcher le rejet.

L'étude consistera à implanter le dispositif d'encapsulation chez une première souche de rats. Les dispositifs seront assemblés avec 5 candidats de membrane présentant des tailles de pore différentes. Afin d'analyser la capacité des différentes membranes à protéger les cellules, plusieurs types cellulaires seront utilisés : îlots pancréatiques isolés chez une autre souche de rats incompatibles avec les rats receveurs, îlots humains et îlots de porc induisant la réponse immunitaire la plus importante chez les receveurs. Ces cellules permettent de tester les différentes situations possibles dans le cas d'une transplantation.

Avant d'injecter les cellules chez des animaux, des tests préliminaires seront réalisés. Des cellules immunitaires des rats receveurs seront mises en contact avec du milieu de culture des différents types cellulaires utilisés. Si les cellules immunitaires réagissent aux milieux de culture, cela signifie que les types cellulaires peuvent effectivement être rejetées par les rats receveur et ainsi être utilisés dans notre étude. Les différents types cellulaires seront ensuite injectés en sous la peau de rats receveurs sans dispositif. Ces tests permettront de confirmer que les types cellulaires choisis induisent bien une réaction immunitaire lorsqu'ils sont injectés libres et surtout déterminer quelle quantité minimale doit être injectée pour obtenir cette réaction. La présence d'anticorps contre les cellules injectées sera recherchée dans le sérum des receveurs juste avant injection (contrôle négatif) puis 30 jours après injection. Si les animaux ont formé des anticorps à partir d'une concentration donnée, cette concentration sera celle injectée dans les dispositifs d'encapsulation dans la deuxième partie de l'étude. Si aucune immunisation n'est observée, le test sera répété avec plus de cellules, sur les mêmes receveurs. Si aucune immunisation n'est observée, même avec la quantité maximale, le type cellulaire ne sera pas injecté dans les dispositifs d'encapsulation.

Dans une seconde phase, des rats receveurs sont implantés avec des dispositifs assemblés avec des membranes de porosités différentes. Chaque animal recevra des injections successives de chacun des types cellulaires, dans l'ordre indiqué plus haut. Les quantités injectées seront celles déterminées dans la première phase de l'étude. Afin d'étudier la réaction de rejet suite à l'injection des différents types cellulaires, les niveaux sanguins de plusieurs marqueurs inflammatoires ainsi que la présence d'anticorps contre les cellules injectées seront déterminés. Si les résultats ne montrent aucune réaction immunitaire pour le 1er type cellulaire, le deuxième sera injecté et ainsi de suite. En cas de résultats positifs, l'étude s'arrêtera pour le receveur qui sera alors mis à mort. Cette étude permettra de déterminer le meilleur compromis entre une protection des cellules et une porosité permettant des échanges optimaux entre l'intérieur du dispositif et la circulation sanguine. La meilleure version du dispositif selon ces critères sera utilisée pour répéter les différentes phases

décrites ci-dessus en injectant 4 sources de cellules sécrétrices d'insuline dérivées de cellules souches.

Le rat a été choisi pour ses similitudes avec l'Homme en termes de réponse immunitaire. Nous avons également choisi d'isoler des îlots pancréatiques chez le rat afin de réaliser des greffes de cellules de la même espèce, cas de figure rencontré en clinique pour toute transplantation. Le recours à une méthode alternative est impossible, car la réponse immunitaire aboutissant à la formation, par le receveur, d'anticorps contre les cellules transplantées est trop complexe pour être modélisée *in vitro*.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera réduite au minimum tout en permettant, grâce à des tests statistiques adaptés, de mettre en évidence des différences significatives au niveau des paramètres étudiés. Les membranes utilisées pour les dispositifs seront préalablement testées *in vitro* pour leurs propriétés de diffusions et leur biocompatibilité afin de ne garder que les meilleurs candidats.

Raffinement : Il intervient au niveau de l'anesthésie, réalisée au gaz pour un meilleur contrôle, et de la prise en charge post-opératoire par l'administration d'un anti-inflammatoire et anti-douleur. Il intervient également un niveau de l'hébergements avec des conditions de température et d'hygrométrie contrôlées, un enrichissement des cages et un accès à volonté à l'eau et à la nourriture. Le raffinement est aussi présent dans le suivi des animaux, avec l'utilisation d'une grille d'évaluation adaptée aux procédures, qui permet de détecter rapidement la souffrance, la douleur chez les animaux et de mettre en place les traitements adaptés.

Au total 202 rat receveurs seront utilisés pour les tests *in vitro*, pour les contrôles positifs permettant de déterminer la quantité à injecter ainsi que pour les tests avec les dispositifs d'encapsulation. A cela s'ajoutent 392 rats d'une souche différente qui serviront pour l'isolement d'îlots pancréatiques pour injection sous cutanée ou dans les dispositifs d'encapsulation. Cela correspond donc à un total de 594 rats.

**19831** Contexte : En France, l'infarctus du myocarde touche 100000 personnes par an. C'est une maladie grave et invalidante provoquée par l'obstruction d'une artère du coeur. Le seul traitement possible est de déboucher l'artère occluse. Bien qu'indispensable, cela provoque des lésions supplémentaires incluant la mort des cellules du coeur et une dysfonction cardiaque. Comprendre les mécanismes sous-jacents constitue donc un grand challenge pour les scientifiques. Au cours des dernières décennies, la prise en charge des patients souffrant d'un infarctus a commencé à s'améliorer, grâce à la meilleure compréhension des mécanismes des lésions d'ischémie-reperfusion, en parallèle du développement de stratégies de cardioprotection. Néanmoins, l'infarctus myocardique reste une maladie fréquente avec un devenir incertain, ce qui confirme la nécessité de constantes recherches pour mieux cibler les solutions thérapeutiques.

Objectifs: Dans la cellule du coeur, une structure intracellulaire importante pour la production d'énergie dans la cellule, la mitochondrie, est au centre de ces mécanismes cardioprotecteurs. Le réticulum, une autre structure servant de réservoir de calcium dans la cellule, semble aussi pouvoir jouer un rôle au cours de l'infarctus du myocarde. En effet, lors d'un stress, une trop grande quantité de calcium libérée par le réticulum peut provoquer la surcharge en calcium de la mitochondrie menant ainsi à la mort de la mitochondrie et donc de la cellule.

Notre projet a pour objectif général de mieux comprendre les échanges calciques entre le réticulum et la mitochondrie au cours de l'ischémie-reperfusion et de proposer une nouvelle stratégie de cardioprotection via l'activation des pompes de calcium dans le réticulum, appelée SERCA, à la reperfusion. Nous travaillerons avec un modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque sous anesthésie gazeuse comme utilisé chez l'homme lors de chirurgie cardiaque : il s'agit donc d'un modèle pré-clinique de référence de l'infarctus du myocarde largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre laboratoire.

Nous étudierons ainsi l'effet de l'ischémie-reperfusion cardiaque sur les pompes SERCA. Par ailleurs, nous chercherons à mieux comprendre l'impact de l'altération du passage du calcium du

réticulum vers la mitochondrie à l'aide d'infection virale des cellules du coeur avec des outils génétiques d'imagerie.

Ce projet comporte donc 5 procédures pour un total maximum de 140 souris sur 3 ans.

Conformité de la règle des 3R :

Remplacement : Notre projet ayant pour but d'étudier la pathologie de l'infarctus du myocarde, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire.

Réduction : Le nombre d'animaux par procédure a été calculé à l'aide d'un logiciel de statistiques afin de déterminer le plus précisément possible le nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, soit 140 animaux sur 3 ans. Par ailleurs, la procédure 2 sur la fonction cardiaque ne sera réalisée que si un effet protecteur est observé dans la procédure 1 par mesure de la taille d'infarctus.

Raffiner : Dans le but d'améliorer le bien-être des animaux et ce, dès leur arrivée dans notre animalerie, un enrichissement de milieu est mis en place et renouvelé très régulièrement aussi bien avant l'expérimentation qu'en soins post-opératoires. Afin de supprimer la souffrance et la douleur, la chirurgie est entièrement réalisée sous anesthésie générale avec prémédication analgésique. De plus, en réactivité vis à vis de l'inspection récente de la DDPP, la chirurgie pour l'injection des adenovirus se fera en faisant une ouverture intercostale pour diminuer la souffrance de l'animal. En soins post-opératoires, nourriture et boisson sous forme gélifiées seront mises à disposition de l'animal en plus de la nourriture et boisson habituelle, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. Une fiche de suivi de chaque animal est complétée régulièrement afin de surveiller le comportement et la santé de l'animal pour ajuster les soins et l'analgésie apportés à l'animal, ou encore pour mettre fin au protocole en concertation avec le vétérinaire et le chef de projet.

En conclusion, lors des prélèvements finaux, d'autres tissus pourront être prélevés et conservés en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la mise en place du projet afin de limiter, optimiser et valoriser au mieux les prélèvements et le nombre d'animaux utilisés dans cette étude.

**19832** Le lupus érythémateux disséminé (LED) est une maladie autoimmune caractérisée par la production d'autoanticorps (anticorps dirigés contre l'organisme) associée à une inflammation pouvant toucher différents organes. Les souris MRL/lpr développent une maladie très proche du lupus érythémateux disséminé humain. L'objet de nos études est d'identifier des molécules (peptides ou petites molécules chimiques) capables d'influencer, de manière bénéfique, le cours de la maladie. Ces molécules sont générées sur la base de cibles que nous caractérisons au travers d'études moléculaires et cellulaires chez l'homme et/ou la souris. C'est ainsi que le potentiel d'un peptide a été évalué et est aujourd'hui en essai clinique avancé chez les patients lupiques. Ce travail nous a permis de valider le modèle murin utilisé (souris femelles MRL/lpr de 6 à 8 semaines) et le protocole utilisé car c'est par les études que nous avons réalisées chez ces souris, dans le protocole indiqué, que ce peptide a pu être caractérisé pour son intérêt thérapeutique.

Nous poursuivons donc cette démarche, soit en testant de nouvelles molécules pour des indications précises de la maladie, soit en évaluant des analogues de la molécule déjà en essai.

Nous testons également des molécules anti-inflammatoires mises au point par nos partenaires.

Les molécules seront administrées soit par gavage, soit par injection Intra-veineuse.

Le syndrome de Gougerot-Sjögren est une maladie autoimmune chronique causée par l'insuffisance de production des sécrétions de certaines glandes, notamment les glandes salivaires et lacrymales. L'apparition de cette pathologie peut être secondaire à un lupus érythémateux disséminé. Nous décidons également de tester notre peptide dans cette pathologie et d'évaluer son intérêt thérapeutique.

Afin de respecter la règle des 3R, nous avons décidé de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de pouvoir réaliser des tests statistiques (tests de Mann et Whitney) mais aussi de compenser l'hétérogénéité de ces souris, nous analyserons des groupes de 10 souris pour chaque molécule

testée, tous les 15 jours pendant 5 ans, soit un total de 3600 animaux (cf. procédures expérimentales). De plus, les souris utilisées pour la partie lupus seront les mêmes que pour la partie Gougerot-Sjögren. Pour répondre à la question du raffinement, les souris seront hébergées par groupes dans des cages de taille réglementaire, sans dépasser le nombre maximal autorisé de souris par cage, et seront rassemblées en groupes sociaux. Les cages seront enrichies avec l'ajout de "nids". Enfin, les souris seront maintenues à une température de 22°C, dans une atmosphère dont le taux d'humidité est de 80% et un cycle éclaircissement/obscurité de 12h/12h, conformément aux conditions optimales demandées par la législation. Elles auront accès à la nourriture et à l'eau de boisson ad libitum. De plus, elles seront anesthésiées avant chaque prélèvement sanguin ou injection. Enfin, pour surveiller la douleur et la limiter, les souris seront observées quotidiennement, en respectant les points limites affichés dans notre animalerie. Nous ne pouvons pas, ici, assurer la règle du remplacement puisque ces études ne peuvent, en aucun cas, être réalisées ex vivo car il s'agit d'études précliniques nécessitant l'animal entier.

### **19833** 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". 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. Cette stratégie thérapeutique est connue sous le nom de "pré-conditionnement ischémique". Il a été démontré plus tard que la même stratégie appliquée au moment de la reperfusion était également efficace pour réduire les tailles de lésion, une stratégie connue sous le nom de "post-conditionnement ischémique". Or, une molécule déjà approuvée chez l'Homme dans un autre contexte, la ciclosporine A (CsA), possède la capacité de mimer les effets du pré- et du post-conditionnement ischémique (en fonction du moment de son administration : soit avant l'occlusion, soit à la reperfusion). Notre équipe a une expérience extensive de ces mécanismes et de leurs effets cardioprotecteurs dans l'infarctus du myocarde. Notre but à présent est d'évaluer l'action de la CsA dans le cadre de l'infarctus cérébral dans un contexte pré-clinique (chez la souris).

#### Description des objectifs du projet

Notre projet a pour objectif général de déterminer le potentiel effet neuroprotecteur de la CsA sur la taille de l'infarctus et sur le pronostic neurofonctionnel, ainsi son mécanisme, au cours de l'AVC ischémique. Nous travaillerons avec un modèle murin d'ischémie-reperfusion cérébrale : il s'agit d'un modèle pré-clinique de référence de l'AVC largement utilisé dans la littérature et maîtrisé par notre équipe. Nous étudierons ainsi l'effet de la CsA administrée soit avant l'occlusion (pré-conditionnement) soit juste avant la reperfusion (post-conditionnement) sur la fonction des mitochondries puis après 1 jour de reperfusion sur cette même fonction et sur la taille de l'infarctus cérébral. Ce projet comporte donc 2 procédures pour un total de 17 souris sur 3 ans.

#### 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 grâce à une pré-étude 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. 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 un 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.

**19834** De nombreuses molécules sont développées à des fin thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

La présente demande d'autorisation constitue la première étape de ce grand projet, elle est destinée à durer 2 ans et à solliciter l'utilisation de 160 souris adultes mâles. Cette première étape consiste à injecter sous anesthésie dans le cerveau les particules développées dans le cadre de ce projet, sans molécule active, mais fluorescentes. Ainsi, les particules pourront être suivies dans le tissu cérébral, ainsi que dans les organes d'élimination de l'organisme, le foie et les reins. Pour cela, les particules seront injectées dans le cerveau de souris sous anesthésie et le suivi se fera de deux manières. D'une part, le parcours des particules dans l'organisme sera suivi dans le temps par un système d'imagerie à fluorescence chez l'animal anesthésié. Cette méthode permet un suivi dans le temps chez le même animal, mais possède une résolution faible. D'autre part, un autre groupe d'animaux sera analysé à différents temps, de quelques heures à quelques semaines après l'injection des particules dans le cerveau, afin d'analyser à l'échelle cellulaire le devenir des particules. La moitié de ce projet se fera avec des animaux suivis dans le temps (imagerie fluorescente), afin de limiter l'utilisation des souris.

Une première étape de ce projet va être effectuée sur des cellules en culture, en remplacement des animaux, afin d'évaluer l'innocuité des particules fluorescentes. Cependant, ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour une partie de l'étude. En effet, nous souhaitons regarder le devenir des particules dans l'organisme, ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation de cellules en culture. Par ailleurs, nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. Enfin, notre projet de nouvelle technologie est trop préliminaire pour être effectué chez l'Homme.

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au stricte nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes : 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps



pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

Les souris seront hébergées avec leurs congénères par groupes de 4 ou 5 dans des cages collectives, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les souris bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leurs cages. Elles seront surveillées tous les jours et pesées toutes les semaines, pour s'assurer de leur bonne santé. Lors de la chirurgie, les souris seront sédatées et recevront des anti-douleurs en plus de l'anesthésie gazeuse. Elles seront monitorées tous les jours pendant 3 jours après la chirurgie. Des critères d'arrêt basés sur le comportement général et la prise de poids seront strictement suivis, et si un animal présente un mal-être trop important, il sera euthanasié.

La première étape de ce projet innovant est indispensable afin d'apporter une preuve de concept en terme de faisabilité, d'efficacité et de non-toxicité de cette nouvelle approche. Cette étude préclinique a pour ambition à terme d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives.

**19835** De nombreuses molécules sont développées à des fins thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

La présente demande d'autorisation constitue la première étape de ce grand projet, elle est destinée à durer 2 ans et à solliciter l'utilisation de 160 souris adultes mâles. Cette première étape consiste à injecter sous anesthésie dans le cerveau les particules développées dans le cadre de ce projet, sans molécule active, mais fluorescentes. Ainsi, les particules pourront être suivies dans le tissu cérébral, ainsi que dans les organes d'élimination de l'organisme, le foie et les reins. Pour cela, les particules seront injectées dans le cerveau de souris sous anesthésie et le suivi se fera de deux manières. D'une part, le parcours des particules dans l'organisme sera suivi dans le temps par un système d'imagerie à fluorescence chez l'animal anesthésié. Cette méthode permet un suivi dans le temps chez le même animal, mais possède une résolution faible. D'autre part, un autre groupe d'animaux sera analysé à différents temps, de quelques heures à quelques semaines après l'injection des particules dans le cerveau, afin d'analyser à l'échelle cellulaire le devenir des particules. La moitié de ce projet se fera avec des animaux suivis dans le temps (imagerie fluorescente), afin de limiter l'utilisation des souris.

Une première étape de ce projet va être effectuée sur des cellules en culture, en remplacement des animaux, afin d'évaluer l'innocuité des particules fluorescentes. Cependant, ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour une partie de l'étude. En effet, nous souhaitons regarder le devenir des particules dans l'organisme, ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation de cellules en culture. Par ailleurs, nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. Enfin, notre projet de nouvelle technologie est trop préliminaire pour être effectué chez l'Homme.

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes : 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps

pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

Les souris seront hébergées avec leurs congénères par groupes de 4 ou 5 dans des cages collectives, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les souris bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leurs cages. Elles seront surveillées tous les jours et pesées toutes les semaines, pour s'assurer de leur bonne santé. Lors de la chirurgie, les souris seront séditées et recevront des anti-douleurs en plus de l'anesthésie gazeuse. Elles seront monitorées tous les jours pendant 3 jours après la chirurgie. Des critères d'arrêt basés sur le comportement général et la prise de poids seront strictement suivis, et si un animal présente un mal-être trop important, il sera euthanasié.

La première étape de ce projet innovant est indispensable afin d'apporter une preuve de concept en terme de faisabilité, d'efficacité et de non-toxicité de cette nouvelle approche. Cette étude préclinique a pour ambition à terme d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives.

**19836** De nombreuses molécules sont développées à des fins thérapeutiques, mais l'accès de ces molécules au cerveau et à leurs cibles au sein du tissu cérébral est encore très restreint. Cela pose des contraintes fortes pour le développement de traitements efficaces pour les maladies du cerveau. Notre projet vise à développer une méthode d'encapsulation qui permet la libération contrôlée dans le temps, l'espace et avec des concentrations précises de molécules. Pour cela, des microparticules ont été développées pour contenir des molécules en quantités contrôlées et pouvoir libérer leur contenu à la demande.

La présente demande d'autorisation constitue la première étape de ce grand projet, elle est destinée à durer 2 ans et à solliciter l'utilisation de 160 souris adultes mâles. Cette première étape consiste à injecter sous anesthésie dans le cerveau les particules développées dans le cadre de ce projet, sans molécule active, mais fluorescentes. Ainsi, les particules pourront être suivies dans le tissu cérébral, ainsi que dans les organes d'élimination de l'organisme, le foie et les reins. Pour cela, les particules seront injectées dans le cerveau de souris sous anesthésie et le suivi se fera de deux manières. D'une part, le parcours des particules dans l'organisme sera suivi dans le temps par un système d'imagerie à fluorescence chez l'animal anesthésié. Cette méthode permet un suivi dans le temps chez le même animal, mais possède une résolution faible. D'autre part, un autre groupe d'animaux sera analysé à différents temps, de quelques heures à quelques semaines après l'injection des particules dans le cerveau, afin d'analyser à l'échelle cellulaire le devenir des particules. La moitié de ce projet se fera avec des animaux suivis dans le temps (imagerie fluorescente), afin de limiter l'utilisation des souris.

Une première étape de ce projet va être effectuée sur des cellules en culture, en remplacement des animaux, afin d'évaluer l'innocuité des particules fluorescentes. Cependant, ce projet est fondamentalement un projet de physiologie intégrée, il est donc nécessaire d'utiliser des modèles animaux pour une partie de l'étude. En effet, nous souhaitons regarder le devenir des particules dans l'organisme, ce qui n'est pas compatible avec l'utilisation de cellules en culture. Par ailleurs, nous n'avons pas encore suffisamment de données pour utiliser des modèles informatiques. Enfin, notre projet de nouvelle technologie est trop préliminaire pour être effectué chez l'Homme.

Le nombre d'animaux estimés pour cette étude princeps est justifié par les différents temps post-chirurgie à analyser, afin d'avoir une cinétique suffisamment précise du devenir des particules lorsqu'elles sont injectées dans le cerveau. Pour tous les groupes, le nombre d'animaux est limité au strict nécessaire pour garantir la significativité. Les 160 animaux seront divisés en 4 groupes : 2 groupes pour l'imagerie *in vivo* et 2 pour l'imagerie *ex vivo*. Pour chaque type d'imagerie, des injections dans le tissu cérébral seront comparées à des injections dans les ventricules cérébraux (poche de liquide dans le cerveau qui permet la communication entre le cerveau et la circulation sanguine/lymphatique de l'organisme). L'utilisation de l'imagerie *in vivo* dans ce projet est destinée à réduire le nombre d'animaux utilisés, puisqu'un même animal peut être observé à différents temps

pour établir une cinétique. La durée du projet étant de 2 ans, cette étude représente l'utilisation de 80 animaux/an.

Les souris seront hébergées avec leurs congénères par groupes de 4 ou 5 dans des cages collectives, avec un accès libre à la nourriture et à l'eau. Les souris bénéficieront d'un enrichissement comportemental dans leurs cages. Elles seront surveillées tous les jours et pesées toutes les semaines, pour s'assurer de leur bonne santé. Lors de la chirurgie, les souris seront sédaturées et recevront des anti-douleurs en plus de l'anesthésie gazeuse. Elles seront monitorées tous les jours pendant 3 jours après la chirurgie. Des critères d'arrêt basés sur le comportement général et la prise de poids seront strictement suivis, et si un animal présente un mal-être trop important, il sera euthanasié.

La première étape de ce projet innovant est indispensable afin d'apporter une preuve de concept en terme de faisabilité, d'efficacité et de non-toxicité de cette nouvelle approche. Cette étude préclinique a pour ambition à terme d'ouvrir la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les maladies neurologiques, neuropsychiatriques et neurodégénératives.

**19837** Lors du développement d'un nouveau médicament à usage humain, il est indispensable de connaître ses propriétés pharmacologiques et son comportement dans un organisme vivant.

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*. 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. Ceci est particulièrement vrai pour les médicaments qui ont pour objectifs de traiter des affections du Système Nerveux Central (SNC). De plus, les procédures de ce projet permettront d'établir une stratégie de prédiction de la biodisponibilité de chaque molécule et/ou d'évaluer leurs effets dont la finalité est d'ajuster la dose administrable à l'Homme.

Réduction:

Durant la période couverte par ce projet, il est prévu d'utiliser principalement des macaques cynomolgus, environ 50 par an (soit un total de 250 pour 5 ans). Des vervets, 10 par an (soit un total de 50 pour 5 ans) et des macaques rhésus, 10 par an (soit un total de 50 pour 5 ans) pourront également être utilisés en fonction des demandes. 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.

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. Le vétérinaire est garant du bien-être des animaux.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse et de le prendre en charge. 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. Des points limites seront 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 ayant pour but d'étudier des molécules ciblant le système nerveux central, 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, lorsque possible et une attention particulière sera accordée à l'enrichissement de leur milieu de vie. 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 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.

**19838** L'hibernation est une adaptation physiologique et comportementale qui permet la survie de l'espèce pendant les périodes saisonnières défavorables (température extérieure basse et pénurie des ressources alimentaires) Tout au long de l'hibernation, afin d'économiser de l'énergie, l'animal va alterner entre des phases d'hypothermie corporelle profonde, appelées torpeurs, et des phases de réveil avec un retour à la normothermie (température corporelle normale régulée autour de 37°C chez les Mammifères et qui est très consommatrice d'énergie). Des travaux récents suggèrent que cette adaptation physiologique de l'animal impliquerait des phénomènes saisonniers de plasticité neuronale, c.a.d. des modifications de la perception par le cerveau, et notamment par l'hypothalamus, des signaux périphériques qui impliqueraient des modifications structurales de la barrière formée par les tanocytes qui tapissent la paroi du 3ème ventricule du cerveau. Ces tanocytes forment une barrière qui régule les entrées des signaux de la périphérie vers le cerveau. L'objectif de ce projet est donc de déterminer si des changements structurels dans la fonction de barrière des tanocytes peuvent isoler l'hypothalamus des signaux périphériques avec des caractéristiques différentes selon le moment du cycle de torpeur/réveil et s'il existe des différences liées au sexe dans ce mécanisme.

Pour ce faire, nous utiliserons des hamsters d'Europe mâles et femelles, une espèce hibernante bien établie. Les animaux seront équipés de dispositifs permettant de suivre leur température corporelle (Tc) tout au long de l'expérience et ainsi d'identifier les phases de torpeur et de réveil durant l'hibernation.

Ils seront soumis à un cycle lumière/obscurité de type jour court (hiver) et à une température ambiante (Ta) de 20 °C ou de 8 °C.

Des prélèvements seront réalisés post-mortem à différents moments du cycle torpeur/réveil.

Pour réaliser ce projet, nous avons besoin de 96 hamsters d'Europe (48 mâles et 48 femelles) distribués en 4 groupes de 12 mâles et 12 femelles.

Remplacement : L'expérience doit être réalisée sur l'animal entier. Aucun moyen de substitution ne permet de modéliser les différentes étapes de l'hibernation et les processus liés à chaque étape (intégrant des modifications métaboliques périphériques et des modifications de structures cérébrales, notamment l'hypothalamus).

Réduction : Sur la base des connaissances acquises sur le modèle animal et sur les techniques utilisées, le nombre d'animaux nécessaire à l'étude a été établi au minimum requis ( $n = 12$ /groupe (mâles ou femelles) pour obtenir des résultats statistiquement significatifs en utilisant des tests statistiques paramétriques et/ou non paramétriques.

Raffinement : Le hamster d'Europe est un animal solitaire, donc chaque animal est maintenu en cage individuelle enrichie avec un bâtonnet de bois à ronger et de la frisure pour faire un nid. Le maximum sera fait pour réduire la douleur et le stress des animaux tout au long de l'expérience. Les procédures invasives envisagées seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie. La température corporelle sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermo-staté. Les animaux seront suivis pendant les 15 jours suivant la procédure et leur état de santé sera évalué au moyen d'une grille d'évaluation de l'inconfort, du stress et de la douleur. Afin de limiter la souffrance induite à l'animal, des points limites ont été définis permettant à tout moment d'exclure l'animal de l'étude (voir Annexe I)

De manière générale, ce projet apportera un approfondissement des connaissances sur la régulation de l'hibernation : une des fonctions physiologiques saisonnières indispensables à la survie de l'espèce.

Trois hamsters supplémentaires sont nécessaires comme contrôles positifs pour valider certaines analyses des marquages immunocytochimiques réalisés sur les cerveaux.

**19839** Plusieurs études montrent que le glyphosate, substance active de l'herbicide, Round up présente des effets néfastes sur la santé animale. Cependant, ces effets et les mécanismes moléculaires ne sont pas clairement élucidés chez la volaille. Notre projet a pour but de déterminer l'influence du Round up sur le métabolisme (poids, engraissement, paramètres plasmatiques), les performances de ponte (nombre et qualité des œufs), la fertilité (mortalité embryonnaire, taux d'éclosion) et les performances de la descendance (indice de consommation, viabilité des poussins) chez la poule reproductrice mais aussi sur la qualité de la semence chez le coq. Cent quatre-vingt poules seront répartis dans 5 lots comme suivant : 3 lots de 20 animaux seront dédiés pour l'étude du métabolisme pendant 35 jours et 2 lots de 60 animaux seront utilisés pour les études sur les performances de ponte et la fertilité de 19 à 35 semaines et l'impact sur la descendance sur 10 jours. Pour ces deux derniers lots, à 25 et 30 semaines d'âge, les poules seront inséminées artificiellement avec du sperme issu de coq de même type génétique et d'élevage classique (n=20 coqs). Les œufs seront collectés pendant 3 semaines consécutives avec mise en incubation régulière après 7 jours de collecte. La fertilité, la mortalité embryonnaire (précoce et tardive) et le taux d'éclosion seront enregistrés au couvoir. Après éclosion, les poussins seront élevés collectivement jusqu'à 10 jours d'âge afin d'évaluer l'impact de l'exposition au Round up des mères sur les performances des poussins (mortalité, croissance et consommation d'aliment). Un suivi métabolique (analyse de paramètres plasmatiques) de la naissance à 10 jours sera réalisé sur 40 poussins (n=20 issus de chacun des 2 lots des mères). Concernant les 20 coqs, une fois les inséminations des poules terminées, nous les exposerons par voie alimentaire au Round up pendant 6 semaines afin de déterminer l'effet sur la qualité de la semence. L'effectif total des animaux soumis à une procédure est donc de 240 (180 poules + 40 poussins + 20 coqs).

La règle des 3R a été respectée comme suit :

- Remplacer : Pour évaluer les réponses physiologiques telles que l'évolution du poids, l'engraissement, la performance de ponte, la fertilité, et la qualité de la semence il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté est la poule, le coq et le poussin dans notre protocole.
- Réduire : Des analyses statistiques ont été réalisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ces analyses ont pris en compte les résultats d'un précédent protocole.
- Raffiner : Les poules, les coqs et les poussins sont élevées au sol dans des conditions d'élevage classique. Les animaux peuvent se voir. Les enrichissements mis en place sont essentiellement des blocs à piquer, des objets suspendus.

**19840** Le cortex cérébral est l'aire cérébrale supportant les fonctions biologiques les plus complexes. Son développement requiert la prolifération de cellules souches, la migration de neurones, leur maturation et finalement leur connexions pour former des circuits neuronaux. Des altérations, mêmes subtiles, du développement cortical peuvent entraîner des troubles psychiatriques comme la déficience intellectuelle, la schizophrénie ou l'autisme. Ces maladies neuropsychiatriques présentent une composante génétique élevée, comme démontré par des études épidémiologiques. Cependant, bien qu'un certain nombre de syndromes génétiques ait été découverts, les gènes altérés chez la majorité des patients neuropsychiatriques avec origine génétique restent inconnus. Notre projet est d'étudier les mécanismes physiopathologiques de formes de déficience intellectuelle et d'autisme chez l'humain liées à la perte de fonction de deux nouveaux gènes responsables : NeuroD2 et Neurog2. Nous utiliserons des souris déficientes pour l'étude de NeuroD2 car elles sont disponibles (KO constitutive ou KO conditionnelle), et des rats sauvages

électroporés in utero avec des plasmides de surexpression ou knock-down (shARN) pour l'étude de Neurog2 étant donné que les souris KO correspondantes sont indisponibles.

Nous emploierons une approche type « biologie des systèmes », de la molécule au comportement. Nous utiliserons le séquençage d'ARN de dernière génération pour déterminer les cascades moléculaires altérées dans le cortex de rongeurs avec délétion/mutation de nos gènes d'intérêts, l'électroporation in utero pour suivre la migration des neurones pendant l'embryogenèse, l'imagerie calcique en 2-photons sur animal vivant pour étudier le remodelage synaptique, l'imagerie calcique avec miniscope Inscopix pour étudier les altérations de l'activité des circuits neuronaux de la mémoire sociale, l'électrophysiologie pour mesurer les propriétés intrinsèques et les interactions synaptiques, et le comportement pour délimiter la contribution des gènes de pathologie sur les fonctions cognitives.

Ce projet durera 5 ans. Nous utiliserons souris et rats, au nombre total maximal de 833 et 222, respectivement. L'avantage de la souris est la grande variété de souches transgéniques existantes, permettant une grande précision dans le ciblage des questions étudiées. Les souris seront issues de différentes lignées transgéniques et soumises à l'expérimentation soit au stade prénatal, postnatal ou adulte. Le rat est un modèle de choix quand nous ne disposons pas des souris transgéniques correspondant au gène d'intérêt, ici Neurog2 ; le rat permet des manipulations par électroporations in utero faciles et est une espèce idéale pour l'étude du comportement animal.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien.

Pour 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 (injection d'analgésiques ou bien mise à mort par injection d'une surdose d'anesthésique). Les animaux seront anesthésiés pour toutes les procédures expérimentales induisant de la douleur, ici des approches chirurgicales. Cette anesthésie, sous forme gazeuse (isoflurane), suit les protocoles standards (induction à 3-4% d'isoflurane puis maintien à la MAC95), et sera accompagnée d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire appropriés (notamment utilisation d'une fiche de suivi individuelle). Le porteur du projet possède une grande expérience dans ce domaine.

Concernant le remplacement, notre recherche des mécanismes physiopathologiques à l'origine de troubles neuropsychiatriques nous amène à devoir étudier le développement du cortex cérébral du rongeur néonatal 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. Aucun modèle de culture cellulaire ne peut donc reconstituer cette complexité. D'autre part, il est encore plus évident que la validation ultime de nos modèles expérimentaux de troubles neuropsychiatriques nécessite des tests comportementaux qui sont faits sur animaux vivants.

**19841** Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles proviennent des mégacaryocytes de la moelle osseuse et adoptent dans la circulation une morphologie caractéristique en forme de disque, dont le maintien dépend d'un anneau de microtubules appelé bande marginale. Les microtubules sont constitués de nombreuses protéines appelées tubulines, qui sont toutes décorées d'une série de modifications post-traductionnelles. Les modifications post-traductionnelles sont des modifications protéiques catalysées par un large éventail d'enzymes. Dans le cas des tubulines, elles sont capables de

modifier les propriétés physiques et biochimiques des microtubules, et nous pensons donc que celles-ci ont un rôle important à jouer dans la formation et le maintien de la bande marginale. Notre projet vise à étudier leur rôle dans la lignée plaquettaire à l'aide d'une série de souris déficientes pour les enzymes impliquées dans leur régulation. Il permettra, à terme d'améliorer le diagnostic et le traitement des patients présentant des maladies plaquettaires.

Les expériences consisteront à réaliser

- i) des prélèvements de sang pour des numérations plaquettaires,
- ii) une évaluation *ex vivo* de la biologie et de la morphologie des plaquettes et de leur réactivité
- iii) une mesure du temps de saignement suite à une coupure au niveau de l'extrémité de la queue de l'animal, qui nous permettra d'appréhender les fonctions hémostatiques dans un contexte *in vivo*.
- iv) une analyse *in vivo* de la remontée du chiffre plaquettaire après avoir induit une destruction des plaquettes (thrombopénie)

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.

Remplacer. Les plaquettes sanguines sont des fragments cellulaires que nous ne sommes pas capables de produire *in vitro*. De plus, une fois dans la circulation sanguine, les plaquettes subissent plusieurs événements de maturation. C'est pour cela que l'utilisation de souris est incontournable.

Raffinement. Une attention particulière est portée au bien-être des animaux afin de diminuer le stress et la douleur. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec des carrés de cellulose et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie et analgésie appropriés avec maintien de la température de l'animal pendant l'anesthésie. Les procédures disposent de points limites adaptés pour limiter la souffrance animale, basés sur des critères observables comme l'attitude ou l'expression faciale, et seront toujours exécutées par du personnel formé.

Un total de 546 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

**19842** Les maladies rares et neurologiques souffrent d'une absence de prise en charge thérapeutique. Le développement au cours de la dernière décennie de biothérapies comme les protéines recombinantes humaines ou les anticorps monoclonaux, ouvre des perspectives très prometteuses de traitement de ces pathologies.

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 avec le sang comme le cerveau ou l'œil. Cela constitue un obstacle majeur pour le développement de ces nouvelles biothérapies.

Ce projet permet d'identifier et caractériser des composés capables de pénétrer dans des organes difficilement accessibles aux traitements, jusqu'à maintenant

Nous développons de nouvelles méthodes de vectorisation de ces molécules c'est-à-dire que nous les couplons à un système spécifique des barrières physiologiques qui doit permettre leur passage au travers de ces barrières. L'objectif de ce projet est d'évaluer la capacité de ces nouvelles molécules à atteindre leur cible d'action. Comme ces barrières physiologiques sont susceptibles d'être modifiées dans certaines pathologies, ces études sont pratiquées soit chez des souris saines soit dans des modèles transgéniques murins de ces pathologies. Les études dans des modèles transgéniques doivent permettre de s'assurer que cette meilleure biodistribution est conservée en situation pathologique. De plus, les biomarqueurs d'engagement de la cible pourront aussi être mesurés dans les échantillons biologiques issus de ces études. Enfin cette approche *in*

*vivo* permettra aussi d'identifier des produits ayant une biodistribution réduite dans les autres tissus afin de diminuer les effets secondaires liés au traitement.

Les avantages qui peuvent découler ce projet sont 1) la validation de la technologie permettant d'augmenter la distribution sélective des molécules thérapeutiques dans des organes précédemment inaccessibles ; 2) Pour une série de molécules étudiées, les données pharmacocinétiques obtenues chez des animaux sains et/ou transgéniques permettront de sélectionner les meilleurs candidats et diminuer fortement les molécules à tester dans des études de démonstration d'activité thérapeutique. Elles aident également à prédire les doses et à déterminer les designs de ces études.

Les produits sont administrés par les voies systémiques classiques (orale, intra-veineuse ...) à des doses qui ne doivent pas induire d'effets secondaires. La biodistribution des produits est évaluée par des dosages dans le sang, éventuellement le liquide céphalo-rachidien (LCR) et les organes d'intérêt. Le LCR est prélevé sous anesthésie. Les organes sont prélevés en fin d'étude après euthanasie des souris.

Les gestes d'administration et de prélèvements peuvent provoquer un inconfort léger et de courte durée. Pour les animaux transgéniques des points limites sont identifiés afin de limiter l'inconfort ou le stress liés au modèle pathologique à une contrainte modérée.

L'efficacité de ces méthodes/technologies est testée dans un premier temps *in vitro* dans des modèles cellulaires, organotypiques ou biophysiques. Ces modèles permettent de sélectionner les meilleurs candidats médicament. Cependant, ces modèles bien que reproduisant certaines caractéristiques des barrières physiologiques, 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. La validation complète de ces nouvelles méthodes/technologies de vectorisation ne peut être faite qu'avec des modèles *in vivo*.

Le nombre d'animaux utilisés dans les études pharmacocinétiques se limite au strict nécessaire pour atteindre l'objectif scientifique validé par une analyse biostatistique réalisée par un expert interne permettant d'optimiser les effectifs et les designs d'étude. En utilisant les prélèvements de liquide et tissus biologiques de ces études pour mesurer des biomarqueurs secondaires, cela réduira le nombre d'animaux nécessaires à la caractérisation complète des composés étudiés. Les produits sont administrés aux doses minimales actives pour minimiser la survenue d'effets secondaires. En fonction des sites de prélèvement de sang, une anesthésie sera pratiquée. Le prélèvement de LCR est toujours pratiqué sous anesthésie sans réveil.

La manipulation des 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 2000 souris sur une période de 5 ans.

**19843** Les tiques et les moustiques sont des arthropodes hématophages nuisibles qui peuvent menacer la santé des animaux d'élevage, la faune sauvage et des personnes par la transmission des pathogènes. La tique *Amblyomma variegatum* est un parasite qui affecte principalement les ruminants contrairement aux moustiques qui ont un spectre d'hôtes plus large.

Notre laboratoire vise à développer de nouvelles stratégies pour réduire, voir bloquer, la transmission d'arbovirus par les arthropodes en utilisant deux modèles d'étude. Le premier modèle inclut les tiques et le pathogène *Ehrlichia ruminantium*, le deuxième modèle inclut les moustiques et les Flavivirus comme pathogènes viraux. Pour mener ces études, une étape cruciale est l'établissement de colonies de laboratoire d'arthropodes cibles pour ces modèles d'étude (tiques et moustiques) et leur entretien en laboratoire. Cela permet d'obtenir des arthropodes en quantités et sous conditions contrôlées, afin d'étudier leur biologie et de générer des échantillons



représentatifs pour évaluer les stratégies à développer pour bloquer la transmission d'arbovirus et mieux comprendre les interactions entre hôte/vecteur et entre vecteur/pathogène.

La principale difficulté pour établir des colonies de laboratoire d'arthropodes hématophages et les entretenir, est de réaliser le gorgement avec du sang.

### 1) Remplacer

Le gorgement des arthropodes hématophages avec du sang d'hôte vertébré est un pré-requis pour réaliser un cycle complet de développement des tiques et moustiques. Cela permet la viabilité des souches de laboratoire et la colonisation de nouvelles souches à partir des populations de terrain d'intérêt.

### 2) Reduire

Le gorgement artificiel n'est pas au point pour *Amblyomma variegatum* et certaines espèces de moustiques : le projet vise donc à établir et à entretenir des colonies de tiques et de moustiques non infectées sur des animaux sains, avec l'objectif ultime de développer des méthodes alternatives de gorgement artificiel.

### 3) Raffiner

Lors de l'expérimentation, les animaux seront observés au minimum deux fois par jour.

Une application topique de crème analgésique sur l'aire exposée aux piqûres des tiques sera réalisée avant l'installation des tiques et après la récupération des tiques gorgées. Ceci contribue à réduire la gêne occasionnée par le gorgement sur l'animal. Par ailleurs, afin de minimiser le stress lié à la procédure, chaque chèvre sera exposée une fois par an seulement à la cage de contention pendant 15 jours. Chaque chèvre sera gardée 5 ans en expérimentation. En cas de dégradation de l'état de l'animal, il sera sorti du protocole, traité et remplacé. De plus, nous travaillerons à supprimer l'utilisation de cages de contention (occasionnant le plus grand stress) pour favoriser l'utilisation de loges communes pour les deux chèvres en expérimentation.

Lors des procédures de gorgement, nous travaillerons aussi sur l'enrichissement spécifique de la loge des chèvres en expérimentation (jouets ...) et l'octroi de récompenses spécifiques (distributions de friandises...) afin de rendre l'expérimentation plus agréable.

De façon similaire, une crème analgésique sera appliquée sur l'aire exposée aux piqûres des moustiques après la récupération des moustiques gorgés afin de réduire la gêne occasionnée par le gorgement sur l'animal. En cas de dégradation de l'état de l'animal, il sera aussi sorti du protocole, traité et remplacé.

Les lapins seront anesthésiés afin de limiter le stress de la contention. Lors des procédures de gorgement, nous travaillerons également sur l'enrichissement spécifique de la cage des lapins en expérimentation (jouets ...) et la distribution de récompenses.

Ainsi, ce protocole de gorgement d'arthropodes tiques et moustiques sur animaux, nous permettra de disposer de tiques à différents stades de développement pour mettre au point le gorgement artificiel sur membranes. Un total de 8 chèvres et 6 lapins seront utilisés dans ce projet.

**19844** Le thème général du projet porte sur l'effet délétère d'une alimentation déséquilibrée sur la mémoire. Une alimentation trop riche en gras et en sucre augmente le risque de problèmes cognitifs comme la mémoire. La période d'adolescence est particulièrement sensible à ce type d'alimentation car le cerveau est encore en maturation. Les conséquences de difficultés de mémoire chez les adolescents sont importantes car elles vont impacter la performance scolaire et influencer la mémoire pour toute la vie. Il est donc important de comprendre la vulnérabilité spécifique à l'adolescence. Le travail chez le rongeur est complémentaire des travaux cliniques car nous travaillons dans des conditions très contrôlées par rapport à l'alimentation et les conditions de vie en général. De plus, des analyses moléculaires ou pharmacologiques au niveau des régions cérébrales sont possibles chez l'animal. Les études comportementales de mémoire couplées à des régimes gras et sucrés ne peuvent se faire que sur des mammifères, il est donc impossible de

remplacer ces expériences par des analyses *in vitro*. Tout cela augmente considérablement les chances de découvrir les mécanismes biologiques impliqués.

Dans ce projet nous nous intéressons à la chrononutrition, c'est-à-dire aux périodes de la journée où les animaux mangent. En effet, les rongeurs, comme les humains, mangent principalement pendant leur période active et ne mangent pas dans la période de repos dédiée au sommeil. Cependant, avec une alimentation grasse et sucrée disponible à tout moment (*ad libitum*), les rongeurs, comme les humains, perdent ce rythme jour/nuit. Or, cette perte de rythme jour/nuit dans l'alimentation est responsable en grande partie des problèmes d'obésité et aussi des troubles de mémoire. Nous voulons maintenant examiner les mécanismes moléculaires impliqués dans ces effets.

Une étude préliminaire chez la souris suggère que le récepteur aux hormones glucocorticoïdes (GR) joue un rôle clef dans ces processus car en bloquant ce récepteur par une drogue injectée en intrapéritonéal nous prévenons les troubles de mémoire. Dans ce nouveau projet nous voulons vérifier que l'action du GR se situe bien au niveau de l'hippocampe, une région cérébrale sollicitée dans le type de mémoire que nous étudions. Pour cela nous devons infuser la drogue localement dans l'hippocampe via des canules implantées dans chaque hémisphère cérébral puis mesurer les performances de mémoire des souris grâce à des analyses comportementales. Comme ce récepteur GR est aussi un facteur qui induit de nombreux gènes en aval, nous voulons mesurer cette activité d'induction de gènes *in vivo* spécifiquement dans l'hippocampe. Pour cela, nous infusions dans l'hippocampe un virus « reporter » contenant une séquence ADN induite par le GR couplée à un fluorophore qui permet de suivre l'induction de cette séquence "reporter" par une fibre optique implantée au même endroit. L'implantation de canules, de fibre optique ou l'injection de virus recombinant dans l'hippocampe de souris sont des approches bien maîtrisées dans notre laboratoire, nous avons tous les équipements (poste de sécurité microbiologique, matelas chauffant, poste d'anesthésie gazeuse au masque) et un protocole de médication précis pour minimiser la souffrance des souris.

Ensuite, nous voulons identifier les gènes de l'hippocampe qui sont induits durant l'apprentissage d'une tâche de mémoire chez des souris nourries à un régime contrôlé par rapport à des souris nourries à un régime gras et sucré donné *ad libitum* ou seulement dans la période active. Pour cela, les souris des différents groupes expérimentaux seront soumises à l'apprentissage d'une tâche de mémoire et seront euthanasiées soit 1h après pour identifier les gènes induit rapidement (gènes dit précoces) soit 12 h après pour identifier les gènes induits plus tardivement. Nous voulons faire ces expériences matin et soir, étant donné l'importance de la période de prise de nourriture comme évoqué plus haut. Ces expériences ne comportent que peu de souffrance pour les animaux, excepté des prélèvements de sang et une mesure en RMN pour la mesure de la masse grasse selon le type d'alimentation. Ces analyses apportent des informations indispensables au suivi des animaux lors des expérimentations ainsi qu'à l'analyse globale des données.

Une fiche de suivi opératoire est remplie pour chaque souris opérée et soumise au comité de suivi du bien-être animal du laboratoire. Des scores de douleur ou d'inconfort sont donnés à chaque visite des animaux suivis. Selon ces scores l'animal est mis à l'isolement pendant 24-48h et traité si besoin ou euthanasié immédiatement si le score est élevé ou si aucune amélioration n'est observée après 48h.

L'avantage de ces approches *in vivo* est la précision sur la région cérébrale analysée et les acteurs moléculaires identifiés. Ces mesures intégrées sur les animaux élevés dans des conditions très contrôlées fournissent des résultats robustes pour comprendre et ainsi mieux traiter les problèmes cognitifs liés à une alimentation déséquilibrée.

Nous utiliserons 354 souris au total, le nombre de souris a été réduit au minimum afin de pouvoir faire des analyses statistiques robustes. Pour les études comportementales, 12 souris par groupe sont nécessaires alors que pour l'analyse de gènes 6 par groupe suffisent. Pour réduire le nombre de souris, plusieurs tests comportementaux sont réalisés sur les mêmes souris. Pour raffiner les expérimentations, plusieurs mesures sont prises: les souris sont hébergées en groupe de 5 avec des enrichissements variés (maison, barre à ronger); elles sont manipulées quotidiennement avant

les tests comportementaux afin de les habituer à l'expérimentateur et ainsi de réduire le stress; au sacrifice les animaux seront anesthésiés pour qu'il n'y ait pas de souffrance. De nombreux tissus sont prélevés outre la région cérébrale d'intérêt. Ces tissus sont conservés au congélateur pour l'utilisation dans d'autres projets.

**19845** Les dispositifs médicaux constituent un élément clé à la fois dans le domaine diagnostique et dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, ils incarnent des produits ingénieux dont la recherche et le développement s'avèrent désormais indispensables pour satisfaire l'ensemble des besoins de santé. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils constituent une source potentielle de réactions indésirables comme des allergies, des irritations, voire des réactions généralisées de l'organisme. Stratégie de remplacement: Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour encore nécessaire pour y parvenir intégralement. En effet, si des méthodes alternatives existent, elles ne permettent pas de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux dispositifs médicaux, en particulier en raison de leur complexité chimique. En l'absence de méthodes alternatives, la réalisation de procédures expérimentales utilisant des animaux est une exigence réglementaire.

Stratégie de réduction: Le nombre minimum d'animaux est défini dans les textes normatifs de référence mais 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 (utilisation possible d'un seul et même groupe référence pour plusieurs groupes différents de produits tests ou réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal).

Les modèles animaux sont aussi définis dans les textes normatifs de référence pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (cobayes, souris, hamsters) et de lapins. L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 38 000 cobayes, 30 100 souris, 5 000 lapins et 200 hamsters soit un total de 73 300 animaux.

Stratégie de raffinement : les conditions d'hébergement et de soins les mieux adaptées à chaque espèce sont définies et mises en place afin d'apporter aux animaux un bien-être optimal tout au long des procédures et de limiter au maximum toute douleur, stress ou angoisse. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (produits anesthésiques et/ou produits analgésiques). Chaque animal fait l'objet d'un suivi individuel sanitaire, clinique et comportemental 7/7 jours par un personnel qualifié (équipes animalière, technique et vétérinaire) et formé à la reconnaissance de critères spécifiques précoces adaptés à chaque procédure expérimentale et permettant une identification optimale d'atteinte des points limites. L'observation d'un ou plusieurs de ces critères génère systématiquement la mise en place par l'équipe vétérinaire d'une action correctrice la plus appropriée pour limiter le plus rapidement possible tout impact sur le bien-être animal (traitements médicamenteux, arrêt temporaire ou permanent de la procédure expérimentale, euthanasie).

Enfin, les animaux grégaires seront systématiquement hébergés en groupes. Tout hébergement individuel doit être scientifiquement justifié, éthiquement approuvé et permettre de maintenir des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères. L'hébergement est enrichi en prenant en compte les spécificités de chaque espèce: des chaînettes sont suspendues aux cages des lapins afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes sont disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent; des objets en bois sont aussi distribués aux lapins et cobayes afin de favoriser l'activité d'exploration et de mastication; des objets de nidification ou des objets en bois sont aussi distribués aux souris et hamsters. Enfin, de la musique est diffusée dans les salles d'hébergement.

Un comité d'éthique et une structure chargée du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

**19846** Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain. Dès lors, ils représentent une source potentielle de réactions indésirables comme une réponse fébrile ou des réactions de toxicité systémique.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation, d'identifier ces risques avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour primordiale pour y parvenir intégralement. En effet, aucune méthode alternative validée ne permet d'évaluer la pyrogénicité avec un large champ de détection (le test LAL permettant d'identifier uniquement la pyrogénicité véhiculée par des endotoxines) ou la toxicité systémique d'un produit en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant.

Des modèles animaux sont donc définis pour chaque type d'essai réglementaire à mener : il s'agit dans ce projet de rongeurs (souris, cobayes) et de lapins. Le nombre d'animaux est défini dans les textes de référence (ex : pharmacopée européenne...). Le nombre estimé d'animaux utilisés sur ce projet est de 1550 souris, 700 cobayes et 9000 lapins soit un total de 11250 animaux sur 5 ans.

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 si nécessaire grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Les rongeurs sont hébergés en groupes sociaux harmonieux. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure chargée du bien-être animal. Concernant les lagomorphes hébergés individuellement, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (bâton à ronger pour les rongeurs 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 chargée du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

**19847** Ki-67 est une protéine présente uniquement dans les cellules qui prolifèrent dans les vertébrés. Sa détection par des analyses histopathologiques est très répandue pour grader les tumeurs dans le cancer. Nous avons récemment montré que le gène codant pour Ki-67 est essentiel pour plusieurs étapes de la tumorigénèse. Des souris dépourvues du gène Ki-67 (Ki-67  $-/-$ ) ne développent pas de tumeurs dans l'intestin. L'enlèvement du gène dans les cellules cancéreuses réduit leur agressivité et empêche le développement des métastases dans les poumons. De plus, Ki-67 affecte la visibilité des cellules cancéreuses par le système immunitaire. Dans cette continuation de notre projet, nous voulons étendre et comprendre les mécanismes moléculaires de ces phénotypes. Ceci est un préalable essentiel pour développer des moyens thérapeutiques de bloquer les fonctions de Ki-67. Nous voulons d'abord confirmer nos observations dans un cancer différent, le mélanome, en faisant des greffes de cellules de mélanome sous la peau. Ceci nécessiterait l'utilisation de 60 animaux immunodéficientes et 60 souris immunocompétentes. Ensuite, nous voulons étayer nos données sur les fonctions moléculaires et cellulaires de Ki-67. Nos données préliminaires *in vitro* suggèrent que les cellules ont besoin de Ki-67 pour être plus adaptables en activant leur génome plus facilement. Nous testerons ceci *in vivo* avec deux types d'expérience. Dans le premier, nous allons irradier les souris pour tester l'adaptabilité des cellules de l'intestin. Ceci nécessite l'utilisation de 48 animaux. Deuxièmement, nous croiserons les souris témoins ou invalidées pour le gène de Ki-67 avec des souris où les cellules épithéliales peuvent être reprogrammées, via un traitement chimique, pour devenir des cellules souches. Nous testerons l'hypothèse selon laquelle Ki-67 sera essentiel pour cette « reprogrammation ». Ceci nécessite l'utilisation de 48 animaux. La troisième type d'expérience permettrait d'identifier d'autres gènes qui agissent ensemble avec Ki-67, via un crible « CRISPR » *in vivo*. Ceci consistera d'une greffe d'une population de cellules de carcinome mammaire, invalidées ou non pour le gène Ki-67, ainsi que 300 autres gènes candidats, sélectionnés au préalable d'après des résultats préliminaires. Cette expérience nécessite l'utilisation de 48 animaux. La validation de 3 de ces gènes nécessiterait 144 animaux. Ces modèles

ont été choisis et conçus (points limites) pour répondre à la question des fonctions de Ki-67, une cible thérapeutique potentielle dans le cancer, tout en étant le moins délétère possibles pour les animaux. Les expériences sont conçues pour éviter la souffrance aux animaux, selon les règles 3R : (raffinement), par exemple en utilisant les anesthésies pour les greffes, en arrêtant les expériences avant les signes de souffrance et en surveillant quotidiennement les animaux pour les points limites correspondant à des signes de souffrance, en enrichissant l'environnement, etc, tel que détaillé dans cette saisine. Un total de 408 souris est donc nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides pour l'ensemble des trois types d'expériences et éviter leur répétition inutile, ainsi limitant le nombre d'animaux utilisés (3R : réduction). Nos expériences avec les animaux seront aussi complétées par des expériences complémentaires en utilisant uniquement des cellules en culture (3R : remplacement). Ainsi, le projet est entièrement conçu pour être en accord avec les règles 3R. Ces expériences permettront de mieux comprendre les fonctions de Ki-67 dans les cancers.

**19848** Spontanément, l'esprit humain est enclin à donner plus de valeur à une nouvelle information qui va dans le sens de ses pré-acquis qu'à une autre qui va les contredire. Dans les sciences cognitives, on appelle cette inclination universelle le « biais de confirmation ». Décrit en divers termes depuis l'antiquité, aujourd'hui ce phénomène est au moins partiellement responsable pour plusieurs problèmes sociaux tels la rediffusion des « fake news ». D'ailleurs, plus une situation est compliquée, plus on est susceptible de recourir à ses acquis quand on est confronté à de la nouveauté et, pour chaque individu, son niveau de susceptibilité à ce phénomène est déterminé par son état mental, lequel varie selon son âge, sa santé mentale, etc.

Pourtant, la question des mécanismes neurobiologiques et de l'évolution de ce « biais de confirmation » a jusqu'ici été très peu étudiée. Ainsi, nous avons conçu une tâche pour souris qui reproduit les éléments clefs de ce biais; surévaluation de nouveaux éléments environnementaux quand ils confirment, et sous-évaluation quand ils infirment, un contenu cognitif (croyances, règles d'association) préalablement acquis. Dans ce projet, il s'agit d'identifier certains comportements composants du biais de confirmation pour ensuite les modéliser, observer et modifier chez la souris, aux niveaux comportemental, pharmacologique et électrophysiologique.

Ce nouveau modèle permet de modéliser chez la souris un biais cognitif qui se manifeste dans la performance d'une tâche entreprise suite à l'acquisition préalable d'une autre tâche, superficiellement semblable mais fonctionnellement distincte vis-à-vis de la première. Les animaux utilisés dans cette étude seront donc des souris au nombre de 1310, issues de centres d'élevages agréés. L'utilisation de ces animaux se justifie pour plusieurs raisons :

1) Aucune alternative ne permet de se passer de l'utilisation de modèles animaux lorsqu'il s'agit d'une caractérisation précise des soubassements neurobiologiques de tout biais cognitif, y compris le biais de confirmation. En effet, ce type d'étude repose sur l'analyse préalable 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'étude, 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 déterminé ce nombre suite à des expériences précédentes utilisant des tests comportementaux analogs. Nous nous appliquerons à préparer méticuleusement les expériences en analysant chaque paramètre, en anticipant les éventuels problèmes et en n'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. Au niveau du raffinement, nous avons tout penser pour assurer le bien-être des animaux expérimentaux. L'hébergement sera enrichi et le poids et état général des animaux contrôlés quotidiennement pendant les expériences, surtout pendant la période de restriction alimentaire. Pour ce qui concerne les animaux qui subiront des chirurgies, un protocole avéré d'anesthésie et d'analgésie sera soigneusement appliqué, avec des contrôles et soins post-opératoires quotidiens le temps qu'il faut. A ce propos, nous utilisons une grille de contrôle pour le suivi des animaux qui nous permet d'identifier le plus tôt possible si un animal a atteint un point limite et nécessite une intervention. Avec la même grille, nous pouvons aussi suivre le bien-être de tout animal présentant le moindre signe clinique de mal être et intervenir si besoin.

**19849** Les produits de santé (médicaments, dispositifs médicaux, etc.) constituent un élément clé dans la dispensation de soins de qualité aux patients. En effet, en alliant innovation et santé, la recherche et le développement s'avèrent indispensables pour favoriser le progrès médical et l'accès aux meilleurs soins à tous.

Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps humain et peuvent donc entraîner des effets secondaires au niveau du site d'implantation : des dégradations importantes des tissus environnants peuvent nécessiter une ré-intervention chirurgicale. Des séquelles fonctionnelles peuvent en résulter dans les cas les plus graves. L'innocuité des produits de santé doit donc être testée pour garantir le bon rétablissement des patients après chirurgie. Par ailleurs, tout produit de santé se doit d'être efficace lors de son utilisation clinique.

Il est donc impératif, comme le souligne la réglementation (ex : ISO 10993, Pharmacopées Nationales, lignes directrices (OCDE), directive 2007/47/CE), de prouver l'efficacité des produits de santé et de réduire au minimum le risque que des réactions indésirables se manifestent avant de proposer un produit sur le marché. Nous sommes fortement engagés dans le développement de méthodes alternatives *in vitro* : tests de cytotoxicité, test d'irritation *in vitro*, test de sensibilisation *in vitro*, modélisation sur cultures tissulaires et analyse mathématique du risque de toxicité. Cependant, les méthodes alternatives existantes à ce jour ne permettent ni de couvrir l'ensemble des risques toxiques incombant aux produits de santé ni d'en tester intégralement l'efficacité, en particulier en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant. L'utilisation d'animaux est alors obligatoire pour y parvenir.

Lorsque la législation et les normes en vigueur imposent de s'assurer de la sécurité et des performances des produits de santé sur des modèles animaux, les rongeurs, les lagomorphes, les petits ruminants ou les porcins sont des modèles privilégiés pour ce type d'étude étant données les similitudes reconnues avec l'organisme humain. L'utilisation du modèle canin est également envisageable dans des cas exceptionnels, mais elle reste très rare pour raison éthique.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est basé sur les recommandations des textes de référence (ex : norme ISO 10993) et sur les contraintes scientifiques (ex : nombre suffisant d'animaux pour assurer la validation scientifique des études). Dès que cela n'impacte pas la santé ni le bien-être de l'animal, l'utilisation d'un même animal est optimisée de sorte à réduire le nombre total d'animaux utilisés (réutilisation d'un même animal après une période de repos ou optimisation du nombre de sites étudiés sur un même animal). L'estimation maximale du nombre d'animaux utilisés sur les cinq années du projet est de 2900 rats, 2500 lapins, 80 cobayes, 200 ovins, 200 porcins, 100 caprins, et 100 chiens soit un total de 6080 animaux.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Quelles que soient les études la douleur est rigoureusement contrôlée et proscrite grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (ex : anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les ruminants sont hébergés en groupes sociaux harmonieux et le plus souvent en extérieur hors période post-opératoire. Les rongeurs et porcins sont hébergés en groupes sociaux harmonieux sauf lorsque les contraintes de l'étude l'empêchent. Dans tous les cas, pour toutes les espèces sociales, l'hébergement individuel devra être justifié et validé par la structure du bien-être animal. Concernant les lagomorphes, des contacts visuels, olfactifs, auditifs voire tactiles entre congénères sont maintenus grâce à la

structure des compartiments. Des enrichissements standards spécifiques à chaque espèce (produits de nidification pour les rongeurs, jouets pour les porcins/chiens et chainette + baton à ronger pour les lagomorphes) sont présents dans les hébergements. Enfin, de la musique est diffusée en salle d'hébergement.

Un comité d'éthique et une structure du bien-être animal intégrant plusieurs vétérinaires travaillent à temps plein de façon à veiller à l'application du meilleur niveau de soin.

**19850** Nos pratiques agricoles intensives actuelles sont soupçonnées d'avoir entraîné d'importantes pertes de biodiversité, par exemple pour les oiseaux, mais aussi une perte massive de 75 % de la biomasse des insectes volants en 27 ans. Bien que les causes soient multifactorielles, les pesticides sont les principaux suspects. En effet, les pesticides et leurs métabolites sont présents partout dans notre environnement et contaminent les nappes phréatiques. En fait, ils sont présents dans nos propres maisons à des concentrations beaucoup plus élevées qu'à l'extérieur, comme en témoigne le fipronil. Un scandale récemment révélé en 2017 a montré comment le traitement illégal de la volaille par le fipronil a entraîné une contamination généralisée des préparations à base d'œufs utilisées par l'industrie alimentaire dans l'Union européenne.

Le fipronil est un insecticide et acaricide qui cible un récepteur des neurones des insectes, mais aussi celui des mammifères. Il provoque de multiples troubles ayant un impact sur les hormones thyroïdiennes et affecte également la mémoire des rats. Il est hydrophobe et est éliminé principalement dans les selles, bien qu'il s'accumule dans la graisse.

L'intestin joue un rôle central en tant qu'interface majeure entre notre environnement et l'organisme. Le tube digestif doit être capable d'assimiler les nutriments tout en traitant les toxines environnementales ou microbiennes. Il doit être capable de contrôler les agents pathogènes tout en préservant son microbiote. Nous avons montré chez la drosophile que:

- Le fipronil induit une élimination des lipides des cellules intestinales, phénomène également observé chez les abeilles. Il diffuse par l'intestin à tout l'organisme, y compris le cerveau, et s'accumule dans le tissu graisseux.

- Cette élimination des lipides est soutenue par l'utilisation des réserves de graisse qui finissent par s'épuiser lors d'une exposition chronique à de faibles doses de fipronil, une hypothèse étant que ce phénomène contribue à la disparition des colonies d'abeilles.

En culture cellulaire *in vitro* de cellules intestinales humaines, celles-ci perdent également leurs réserves lipidiques, à des doses non toxiques pour la cellule, suggérant ainsi un mécanisme conservé au cours de l'évolution.

Ce projet a pour but de déterminer dans quelle mesure ces résultats sont transposables dans un modèle mammifère, la souris en l'occurrence, qui possède un épithélium intestinal complexe et qui est soumis à un microenvironnement plus proche de celui de l'homme. De ce fait une approche *in vivo* est nécessaire pour permettre de reproduire ces interactions cellulaires qui n'existent pas *in vitro* et de mieux comprendre l'impact sur les mammifères de l'exposition généralisée aux pesticides.

Remplacer : Des expériences ont été réalisées préalablement chez la Drosophile afin de définir les conditions optimales, ainsi qu'*in vitro* dans un modèle de cellules intestinales humaines.

Réduire : Nous envisageons l'utilisation de 10 souris par point d'expérience, nombre suffisant afin d'obtenir des résultats significatifs du point de vue statistique.

Raffiner : Le modèle murin est choisi dans le but de reproduire le plus fidèlement possible les infections étudiées chez la Drosophile. Les conditions de travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associées aux procédures expérimentales. L'exposition au fipronil sera réalisée de façon contrôlée et de façon à ne pas être dommageable à l'animal en utilisant notamment des doses minimales sur des temps de contact relativement courts.

Un nombre total de 180 animaux d'expérimentation est envisagé pour l'ensemble des conditions, que ce soit par exposition aiguë ou chronique au fipronil dans différents modèles de souris.

**19851** La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la fonctionnalité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé dans l'encodage et le traitement de différentes modalités mnésiques. De nombreuses données cliniques obtenues chez des patients mais également des données expérimentales obtenues sur des modèles murins de la MA montrent qu'il existe un dimorphisme sexuel avec une apparition plus précoce et un développement plus rapide de la pathologie chez les souris femelles par rapport aux souris mâles. Ce projet constitue une extension d'un travail de thèse récemment réalisé au sein de l'équipe. Il vise à caractériser comment la plasticité du transfert d'information, un des mécanismes utilisés par le cerveau pour l'acquisition et la restitution de traces mnésiques, est affecté par la MA. A cette fin, un modèle de la MA basé sur des souris génétiquement modifiées est utilisé. L'approche expérimentale consiste dans l'enregistrement des propriétés électriques (électrophysiologie) de neurones de l'hippocampe sur des tranches de cerveaux de souris femelles contrôle et génétiquement modifiées. Un total de 320 animaux sera utilisé dans ce projet.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises:

(1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction);

(2) Des conditions d'enrichissement du milieu pour les animaux (nids, tunnels, maintien de groupes sociaux stables) sont utilisées afin qu'ils puissent s'adonner à des comportements naturels (fouissage, redressement, fabrication de nids) sans pour autant perturber de façon majeure la fonction synaptique. Ces protocoles ont été développés et raffinés par les membres du laboratoire depuis plusieurs années pour maximiser la simplicité et l'efficacité réduisant ainsi la souffrance des animaux (raffinement).

(3) La souris constitue un modèle éprouvé pour l'étude des mécanismes de transmission et plasticité synaptique. A ce jour, les seuls modèles animaux de la MA sont des modèles murins transgéniques (remplacement).

Afin de réduire la douleur, les procédures expérimentales sont réalisées sous anesthésie et en présence d'une couverture analgésique. Un suivi post opératoire est réalisé durant 4 jours. Si un signe de douleur apparaît, un protocole de nursing est mis en place et une injection de NaCl et/ou d'analgésique est réalisée.

Des points limites suffisamment précoces sont définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

**19852** Le denti (*Dentex dentex*) et le corb (*Sciaena umbra*) sont deux espèces de poissons côtiers européens, emblématiques de la Méditerranée, qui sont très largement exploitées par la pêche récréative et professionnelle. A ces deux espèces correspondent ainsi un statut « Vulnérable » (VU) sur la liste rouge IUCN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) depuis 2011 pour la Méditerranée.

Alors que le denti n'est pas sujet à des restrictions quelconques sur les captures en France (e.g. taille minimale de débarquement, calendrier de capture), le corb est interdit à la pêche récréative (pêche à l'hameçon et chasse sous-marine) dans les eaux maritimes corses jusqu'en 2023 (arrêté n°R20-2018-12-20-002).

Dans ce contexte, ce projet vise à tester la faisabilité de relâché de juvéniles de denti et de corb, nés en écloserie, afin de soutenir les populations naturelles en Méditerranée.

Etant donné que le stade larvaire de ces deux espèces est extrêmement sensible (stress, manipulation, etc), c'est le stade juvénile sur lequel nous nous focaliserons dans ce projet.

La première exigence d'un potentiel relâché de poissons issus d'élevage réside dans la bonne santé des animaux. Mais en partant de l'idée que trouver de la nourriture et échapper aux prédateurs sont



deux autres exigences nécessaires à la survie post relâché de juvéniles nés en élevage, ce projet est ainsi dédié à l'étude des performances individuelles des juvéniles de denti et corb produits en éclosion afin d'évaluer leurs comportements de prédation, de fuite, d'exploration ainsi que les performances de nage, mécanismes indispensables à leur survie dans le milieu naturel.

Il est connu que les méthodes d'élevage, notamment l'environnement (habitat) et l'alimentation, ainsi que le stade de développement individuel peuvent influencer, chez certaines espèces, leurs réponses comportementales ou leurs performances.

Ainsi, il semblerait important d'estimer (1) la taille pour laquelle les juvéniles de ces deux espèces (denti et corb) ont des capacités suffisantes pour évoluer en milieu naturel et (2) les conditions d'élevage (en lien avec l'habitat et l'alimentation) propices à un comportement naturel (e.g. de prédation, de fuite, d'exploration).

Ces mesures seront effectuées par le biais de 4 tests comportementaux et physiologiques : un test de réponse de fuite permettant d'évaluer les performances de fuite d'un individu suite à une stimulation, un test de nouvelle proie permettant de quantifier les performances de chasse d'un individu (comportement de prédation) face à des proies vivantes, un test de labyrinthe en Z permettant de déterminer la capacité d'exploration et le comportement d'audace individuel (prise de risque) et enfin un test de mesure de la vitesse de nage critique via un tunnel de nage afin d'évaluer les performances de nage individuelles.

Suite à chaque test, une biométrie sera effectuée afin de relier les performances individuelles des juvéniles testés avec leur taille et poids.

Ces connaissances pourront, ainsi, nous permettre d'estimer une taille ainsi qu'une méthode d'élevage pour lesquelles ces individus seront plus à même de survivre dans le milieu naturel. Ces connaissances pourront, dans le futur, fournir des éléments d'aide essentiels à une gestion restauratoire de ces deux espèces dans le but de maximiser les chances de survie post-relâché d'individus d'élevage dans le milieu naturel. Cette étude est donc une étude pilote dans le but d'estimer, grâce à des tests en bassins, l'efficacité de relâché de ces individus dans le milieu.

Les individus testés seront tous nourris et observés quotidiennement. De plus des mesures quotidiennes des paramètres physico-chimiques seront effectuées (température, pH, oxygénation, taux de nitrites, nitrates, ammonium, etc.). Des points limites seront mis en place sur la base de l'observation des comportements (tout poisson présentant une coloration et/ou un comportement atypique -e.g. mélanisation, nage erratique- ou une réaction anormale par rapport au groupe -e.g. agressivité, fuite- sera isolé et euthanasié avec une surdose de benzocaïne) et du monitoring quotidien de la qualité de l'eau (la température devra être maintenue stable avec une variation maximale de 2°C et l'oxygène entre 80 et 100% de saturation).

Un total de 4860 individus seront utilisés pour ce projet, soit 2430 juvéniles de chacune des deux espèces de poissons (2430 corbs et 2430 denti). En effet, afin de limiter le stress mais également d'éviter tout phénomène d'entraînement, tout individu ne sera testé qu'une seule fois et sur une seule expérimentation. Une seule exception sera faite pour le test de prédation qui induira un marquage individuel des poissons à tester afin de pouvoir tester plusieurs fois le même individu et évaluer l'effet d'un entraînement à la chasse sur les performances individuelles de prédation.

A la fin de chaque test individuel, les individus repartiront dans le circuit d'élevage, qui est le cœur de la station d'accueil, pour des fins piscicoles (production).

L'effectif de poissons testés a été choisi sur l'exemple de travaux de la littérature et permettra d'obtenir un nombre d'individus testés par condition suffisant à des analyses statistiques puissantes (Réduction, règle des 3Rs de Russell et Burch). De plus, afin de minimiser le stress et la souffrance, les individus seront transportés dans des contenants d'eau sur de faibles distances entre le bassin d'élevage et le bassin expérimental (plutôt qu'avec une épuisette), des suivis quotidiens de la qualité de l'eau, des comportements des poissons et des paramètres physico-chimiques seront effectués, les individus testés seront anesthésiés pour les mesures biométriques individuelles, un temps d'acclimatation leur sera toujours accordé entre le transfert dans le bassin expérimental et le début du test et ils seront également toujours élevés en groupe pour limiter le stress (Raffinement, règle

des 3Rs). Enfin, le Remplacement (règle des 3Rs) nous est impossible pour ce projet car nous étudions directement l'effet de la taille et de l'environnement d'élevage sur les performances individuelles des juvéniles.

**19853** Le cancer est la deuxième cause de décès dans les pays développés après les maladies cardiovasculaires. Les traitements conventionnels de nombreux cancers tels que la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ont démontré des limites d'efficacité nécessitant un besoin urgent de nouvelles stratégies thérapeutiques.

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

La perspective de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité (absence de toxicité) de ces nouveaux vecteurs pour traiter des pathologies.

En premier lieu, la tolérance de ces nouveaux vecteurs sera déterminée. Puis, nous vérifierons la présence de ces vecteurs dans différents tissus sains avec une expérimentation de biodistribution. Les effets secondaires dus à l'injection des virus seront surveillés et des critères d'interruption de l'expérimentation en fonction de l'aspect clinique moribond des animaux seront mis en place pour limiter le stress et la souffrance des animaux. Du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments cellulaires pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèle animal est incontournable.

Les résultats de sur la détermination de la dose non toxique et de biodistribution obtenus dans ce protocole nous permettront de déterminer par la suite la dose sub-létale dans les protocoles d'expérimentation thérapeutique. Ces virus seront injectés dans des souris porteuses de tumeurs murines ou humaines (implantées soit en souris immunocompétentes, soit en souris immunodéficientes) afin de déterminer *in vivo* l'activité thérapeutique anti-tumorale de nouvelles générations de virus oncolytiques.

Pour les expériences que nous mènerons nous serons vigilants à mettre en œuvre la règle des 3R:

- Réduire le nombre de souris utilisées : avant d'être testés chez l'animal, ces virus candidats médicaments auront été évalués *in vitro* sur des modèles cellulaires de tumeurs humaines et murines établies et caractérisées, ainsi que dans des cellules primaires (non tumorales) pour sélectionner les virus-candidats médicaments ayant une activité antitumorale et ne présentant pas de cytotoxicité.

- Remplacer : du fait de l'absence de système *in vitro* comportant tous les éléments pouvant interférer avec la réplication virale, et permettant de mimer leurs interactions et leur mode d'action, l'emploi de modèles animaux est incontournable. Un nombre maximal de 1220 souris est envisagé pour ce projet.

- Raffiner : Tout au long de leur vie, une attention particulière est portée au bien-être des animaux en particulier par un enrichissement de leur milieu de vie qui leur permet d'assouvir les comportements liés à leur espèce, tel que du matériel de nidification. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux pendant toute la durée des expérimentations. Ces expérimentations sont réalisées par des techniciens rompus à ses manipulations afin de garantir la bonne reproductibilité des expériences et un suivi optimal du bien-être des animaux.

Les procédures expérimentales seront arrêtées le plus précocement possible sur la base de points limites permettant de réduire le stress et la souffrance de l'animal.

**19854** Les cancers de l'ovaire restent particulièrement meurtriers du fait de leur capacité à développer une résistance aux chimiothérapies conventionnelles, le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques susceptibles de surmonter la chimiorésistance constitue un enjeu majeur pour l'amélioration de leur prise en charge.

La littérature récente a montré le rôle majeur de la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans la carcinogenèse d'une grande variété de localisations tumorales. Cette protéine est maintenant désignée comme une cible thérapeutique prioritaire. Dans le cadre d'une coopération avec des chimistes, nous avons ainsi démontré le potentiel d'une nouvelle catégorie de structures chimiques, comme perturbateurs des interactions protéine-protéine au sein de la famille Bcl-2, et identifié plusieurs molécules d'intérêt pour l'inhibition de Mcl-1. Ces dernières sont capables d'induire l'apoptose *in vitro* sur des lignées tumorales ovariennes chimiorésistantes. De plus, des résultats préliminaires *in vivo* ont montré un effet anti-tumoral important de la molécule chef de file sur plusieurs lignées tumorales ovariennes implantées chez des souris immunodéprimées.

L'enjeu de ce travail sera de valider l'effet anti-tumoral de nos molécules (administrées par voie IP) sur des modèles de souris immunodéprimées injectées ou implantées en sous-cutané avec des lignées cancéreuses ovariennes humaines ou des fragments de tumeurs ovariennes de patientes. Leur effet sera comparé à l'effet des molécules de référence au moment de l'expérimentation (par exemple l'AMG176 aujourd'hui). Les effets des molécules seront évalués par micro-Tomographie par Emission de Positons ( $\mu$ TEP) afin de valider l'effet anti-tumoral de nos molécules et par IRM (imagerie par résonance magnétique) pour suivre l'apparition des zones de nécroses dans les tumeurs suite aux traitements. La présence de larges plages de nécroses a en effet été observée majoritairement dans les tumeurs portées par les souris traitées avec la molécule lors des expériences préliminaires, mais également dans quelques tumeurs non traitées.

Le nombre d'animaux maximum nécessaires pour mener à bien ce projet est de 270 sur 5 ans.

Même si le passage chez l'animal est obligatoire pour répondre aux questions scientifiques posées par ce projet, un soin particulier a été porté au respect du principe de la loi des 3R, notamment par l'utilisation d'un minimum optimal d'animaux utilisés pour satisfaire aux exigences statistiques et répondre à l'objectif du projet (Réduction) et par l'utilisation de méthodes pour veiller au bien-être des animaux (Raffinement). En effet, l'IRM et la  $\mu$ TEP permettent un suivi longitudinal et par conséquent une réduction du nombre d'animaux dans les études. De plus, ces méthodes peu invasives permettront de réduire la souffrance et l'inconfort des animaux (Raffinement).

Les protocoles de traitements seront menés avant que la taille totale des tumeurs ne puisse gêner le bien-être des animaux. D'autre part, une souffrance visible liée au développement tumoral sera considérée comme point limite, de même qu'une détresse caractérisée par une perte de poids supérieure à 15% ou une prostration de l'animal. Ces points limites donneront lieu à l'euthanasie de ces animaux au système immunitaire déficient (prérequis indispensable à l'implantation de cellules tumorales d'origine humaine). Cette euthanasie sera réalisée sur des animaux préalablement anesthésiés.

**19855** La créatine (Cr) est une molécule qui permet aux cellules cérébrales et musculaires de se constituer une réserve d'énergie. Elle passe dans le sang et rentre dans le cerveau et les muscles via le transporteur de la créatine (CRTR). Le déficit en transporteur de la créatine lié à l'X est une maladie neurologique rare dans laquelle l'absence de Cr au niveau cérébral conduit à des retards mentaux sévères, un syndrome autistique et des crises d'épilepsie chez les enfants. Cette maladie représente 1 à 2% des retards mentaux liés à l'X. A ce jour, aucun traitement n'est disponible. En effet, les approches par supplémentation en Cr ne sont pas efficaces du fait de l'absence de passage passif de la Cr à travers la barrière hémato-encéphalique et la membrane des cellules cérébrales en l'absence de transporteurs.

Nous avons démontré que l'utilisation du Dodecyl Creatine Ester (DCE) sous forme de microémulsion permet l'amélioration des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie ainsi qu'une restauration des niveaux de Cr dans différentes aires cérébrales. Pour mieux caractériser ce composé et ses effets, il est important de mettre en place des outils de suivi non invasifs et de poursuivre ces expériences dans des modèles d'étude précliniques plus pertinents.

L'objectif de ce projet est double : 1/ valider une stratégie thérapeutique innovante utilisant une microémulsion de DCE administrée par voie nasale et 2/ valider des méthodes d'imagerie originales pour suivre la restauration des niveaux de créatine cérébraux *in vivo*.

En effet, la créatine étant présente de façon naturelle dans les organismes vivants (exceptés ceux qui ont la maladie du déficit en transporteur de la créatine), nous utilisons de la créatine marquée au deutérium pour la différencier de la créatine endogène. Le deutérium porté par la créatine peut ensuite être détecté par IRM. Le bénéfice de cette étude est d'intégrer, dans un projet de développement préclinique, des outils d'imagerie permettant d'étudier la pharmacologie de molécules médicamenteuses dérivées de composés endogènes, et de raffiner les protocoles expérimentaux en utilisant moins d'animaux sur un suivi longitudinal et en évitant de sacrifier des animaux. Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, ces nouveaux outils d'imagerie fournissent des biomarqueurs qui trouveront une place majeure dans le contexte clinique. Ces biomarqueurs pourront permettre le suivi de l'efficacité des traitements chez les patients (enfants), et aider à l'ajustement des doses thérapeutiques.

Le projet comporte deux volets :

1) Une étude sur 200 souris, dans laquelle nous évaluerons l'incorporation cérébrale et périphérique du DCE par IRM dans des animaux sains et dans des animaux transgéniques modèle de la pathologie (déficient pour le transporteur de la créatine). Nous utiliserons l'imagerie IRM du deutérium ou non pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements sanguins seront effectués en complément, après chaque examen IRM, pour mesurer la concentration plasmatique de créatine marquée.

2) Une étude sur 6 macaques sains pour démontrer l'efficacité du mode d'administration intranasale et étudier la biodistribution cérébrale du DCE par IRM. Nous utiliserons également l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements de sang et de liquide céphalorachidien seront effectués en complément.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui d'évaluer l'effet de cette stratégie thérapeutique d'utilisation de la voie nasale pour cibler directement le cerveau (voie « nose-to-brain ») via les nerfs olfactifs et trijumeaux. Seul un modèle animal permet de tenir compte des interactions structurelles et fonctionnelles de ces nerfs et cellules, et ainsi de valider un biomarqueur d'imagerie *in vivo* et une voie d'administration originale. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviendront d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions.

Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

**19856** Les maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer, d'Huntington et les ataxies spinocérébelleuses (SCA) sont une préoccupation croissante en santé publique. Malgré d'importants efforts de recherche, il n'existe encore aucun traitement capable de combattre de façon efficace la progression de ces maladies.

Des nouvelles approches thérapeutiques sont essentielles pour progresser dans la prise en charge de patients. Parmi ces nouvelles approches thérapeutiques prometteuses se trouvent la thérapie génique. Elle utilise l'ADN pour soigner ou prévenir de la maladie. Selon la pathologie, cet objectif peut être atteint en délivrant aux cellules un gène à action thérapeutique (transgène) qui surexprime la protéine déficiente dans la maladie. Ces acides nucléiques sont le plus souvent transportés dans les cellules grâce à un vecteur viral. La preuve de concept de cette stratégie dans des modèles murins pour ces maladies neurodégénératives a déjà été montrée.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer la faisabilité et l'efficacité de l'administration par thérapie génique à l'aide d'un vecteur adéno-associé (AAV), dans le but de choisir le sérotype viral ainsi que la voie et le lieu d'administration les plus appropriés pour cibler la région d'intérêt.

Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomiques et fonctionnels du système nerveux central (SNC) et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

3R : Il nous est impossible de remplacer l'animal par une simulation informatique ou d'autres méthodes expérimentales car le cerveau du primate non humain (NHP) est un organe plus complexe par rapport aux rongeurs et plus proche du cerveau humain (taille et anatomie). Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les animaux recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés, une période d'acclimatation de 2 semaines est observée à l'arrivée des animaux. Le présent projet limitera le nombre d'animaux au strict minimum 40 PNH, et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence d'AAVs dans leurs organes. Des examens cliniques journaliers et l'application de critères d'arrêt de protocole permettront de veiller au bien-être des animaux.

Les procédures chirurgicales seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et 2 neurochirurgiens. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (IRM), pour repérer les sites d'injection avant la chirurgie et pour vérifier si le produit thérapeutique est bien toléré, renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

**19857** Notre axe de recherche cible les maladies génétiques rares qui touchent les muscles dont les myopathies font partie. Ces maladies neuromusculaires entraînant une dégénérescence du tissu musculaire réduisant drastiquement l'espérance de vie. Le but de notre équipe est de créer et/ou de caractériser des modèles animaux de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester l'éventuelle amélioration de la maladie grâce à différentes approches thérapeutiques.

Cette étude porte sur une forme sévère de myopathie responsable de l'anomalie fonctionnelle d'une protéine particulière, la myotubularine. Nous avons démontré dans une étude antérieure un lien fonctionnel entre la myotubularine et la protéine TIAM. Effectivement, cette protéine TIAM est dérégulée dans un modèle murin de myopathie myotubulaire. Afin d'étudier le lien *in vivo* et un potentiel effet thérapeutique, nous souhaitons moduler le niveau de la protéine TIAM dans des souris atteintes de myopathie myotubulaire. Pour ce faire, nous évaluerons chez l'animal sain si la diminution ou l'absence de TIAM cause un phénotype de myopathie similaire aux souris malade atteintes de myopathie myotubulaire, et si la diminution ou l'absence de TIAM dans le modèle de myopathie myotubulaire améliore le phénotype de ce dernier.

La souris étant physiologiquement et structurellement assez proche de l'Homme, ce modèle animal nous permet d'étudier d'une part la physiopathologie et d'autre part l'amélioration des symptômes apporté par le traitement thérapeutique. De plus, le phénotype de ces animaux mutants est connu et très bien décrit dans la littérature, ce qui est un atout pour l'évaluation des potentiels effets bénéfiques du traitement. Une étude exclusivement réalisée sur des cellules ne pourrait pas se suffire à elle-même car les effets sur l'ensemble de l'organisme et l'évaluation sur le bénéfice de la force musculaire seraient impossibles à évaluer (REPLACEMENT).

Plusieurs procédures expérimentales (maximum une /jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). Nos précédentes études et notre expertise sur ce modèle murin montrent qu'il est nécessaire de prévoir au minimum 16 animaux par groupe

afin d'obtenir une bonne puissance statistique et pour garantir la validité scientifique de l'étude. Ainsi, pour cette étude nous évaluons un total de 476 souris.

Les myopathies sont des maladies entraînant des difficultés de locomotion, par conséquent de la nourriture sera placée dans la cage afin de soulager l'animale dans ses déplacements. Le bien-être des animaux sera contrôlé quotidiennement afin de détecter au plus tôt les premiers signes de souffrance et de la prendre 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 l'arrêt du protocole. En cas de douleur intense, un analgésique pourra être administré et l'étude sera prématurément stoppée (RAFFINEMENT).

**19858** Parmi les outils à disposition de la communauté scientifique pour découvrir de nouveaux traitements possibles de pathologies humaines, nous retrouvons l'utilisation du modèle animal et la modélisation informatique *in silico*.

Ces deux approches présentées souvent en antagonisme, s'avèrent pourtant extrêmement complémentaires et doivent se nourrir l'une l'autre.

Dans un premier projet, nous avons utilisé le modèle animal Souris afin de générer des échantillons de tumeurs ayant pour source des mutations à caractère oncogène, c'est à dire susceptibles d'entraîner l'apparition de tumeurs.

Notre modèle d'étude était le cancer du sein, reproduit par des cancers de la mamelle chez la Souris.

Ces échantillons ont ensuite été analysés histologiquement, mais aussi au niveau des gènes et des protéines exprimés dans ces tissus.

L'ensemble des données générées ont été utilisées pour mettre en place une vaste modélisation *in silico* dont le but serait d'aider à la prédiction ou la validation de nouvelles cibles potentielles dans le traitement des tumeurs ayant notamment une origine génétique.

Par le biais de ce modèle *in silico*, plusieurs prédictions ont été émises sur les traitements les plus appropriés pour cibler les tumeurs apparaissant sur les différentes lignées de souris étudiées.

A partir des prédictions *in silico*, ce sont d'abord des études *in vitro* qui ont été réalisées sur des systèmes cellulaires ou organoïdes. Ce sont les hypothèses validées *in vitro* qui seront testées *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 4 lignées pertinentes et souhaitons traiter celles-ci avec 4 molécules différentes, et ce à deux stades différents (précoce ou tardif) afin de mettre en évidence les modes d'action et la valeur prédictive de notre modèle. Par ailleurs, 1 des lignées sera testée avec 2 molécules supplémentaires, au vu des résultats *in silico* et *in vitro*.

**REDUCTION** : les analyses effectuées dans le projet précédent nous ont permis de constater que dix animaux par groupe expérimental sont nécessaires pour obtenir des effectifs suffisants pour les analyses histologiques et protéiques prévues. Ce nombre constitue un compromis idéal entre la puissance statistiques nécessaire et les impératifs de réduction que nous voulons appliquer dans notre étude.

Au total, dans ce projet, nous prévoyons d'analyser 500 animaux (4 groupes traités comprenant chacun 10 animaux + 2 groupes contrôles comprenant chacun 10 animaux, à 2 temps expérimentaux, pour 4 lignées différentes + 2 groupes traités comprenant chacun 10 animaux pour 1 des lignées à 1 temps). De plus 192 animaux seront nécessaires pour générer les animaux expérimentaux. Soit un total de 692 animaux pour l'ensemble du projet.

**RAFFINEMENT** : les quatre modèles de Souris porteurs de mutation génétiques entraînant l'apparition spontanées de tumeurs ont déjà été étudiés durant le projet précédent. Cette

connaissance préalable nous permet de mettre en place les points limites nécessaires ainsi que les stades opportuns pour l'analyse des tumeurs selon chacune des lignées. Des points limites spécifiques sont donc liés à l'apparition et au volume des tumeurs, mais aussi à l'évolution du poids et de l'état général des animaux. De plus, étant donné que les traitements seront administrés par voie orale ou par injection de manière répétée, des points limites seront définis pour ces voies, en surveillant le site d'injection ou les minutes suivant les gavages. D'une manière générale, toutes les dispositions seront prises pour conserver les animaux dans les meilleures conditions possibles, avec un enrichissement, des conditions d'hébergement optimales, une surveillance quotidienne de leur état et des mesures précises des tumeurs deux fois par semaine.

**REMPLACEMENT** : Ce projet vise à valider une étude réalisée sur un modèle informatique. Pour cela, nous n'avons pas d'autre option que d'utiliser le modèle animal qui apporte les réponses les plus proches de l'humain. Ce projet vise notamment, par cette validation, à fournir à la communauté scientifique un modèle informatique validé par des analyses *in vivo*.

**19859** Les plaquettes sanguines sont les principaux acteurs de l'hémostase, processus physiologique permettant l'arrêt des saignements. Elles naissent dans la moelle osseuse et adoptent, une fois dans la circulation sanguine, une morphologie caractéristique en forme de disque dont le maintien dépend d'un anneau sous-membranaire de microtubules appelé bande marginale. Les microtubules sont constitués de nombreuses protéines appelées tubulines qui, si elles sont absentes ou mutées, peuvent conduire à des pathologies plaquettaires chez l'Homme. Typiquement, les pathologies plaquettaires liées aux tubulines se caractérisent par des défauts d'assemblage de la bande marginale et se répercutent sur la qualité et la quantité des plaquettes circulantes dans le sang. En effet, les plaquettes perdent leur forme discoïde au profit d'une forme sphérique, plus volumineuse, et sont généralement deux à trois fois moins nombreuses que la normale. L'objectif de notre projet scientifique consiste à étudier le rôle des différentes tubulines dans l'assemblage de la bande marginale et évaluer leur importance dans la formation et les fonctions plaquettaires. Les bénéfices attendus visent à améliorer le diagnostic et le traitement des patients atteints de maladies plaquettaires.

Aujourd'hui, les résultats dont nous disposons indiquent un rôle majeur pour deux tubulines dans la formation et les fonctions des plaquettes. En effet, les souris qui ne les expriment plus présentent i) une diminution de la numération plaquettaire sanguine et ii) une forte tendance hémorragique. Ainsi, nous souhaitons débiter des expérimentations chez ces souris dans le but de caractériser i) la formation des plaquettes par mesure de leur durée de vie dans la circulation et ii) les processus hémostatiques via un modèle de thrombose locale au laser et iii) les processus hémostatiques via un modèle de thrombose généralisée de thromboembolisme. Les procédures impliqueront i) l'injection d'un marqueur suivi de plusieurs prélèvements sanguins à 5 points étalés sur 4 jours, ii) une opération sous anesthésie pour modéliser la thrombose locale (laser, mésentère) sans réveil des animaux, et iii) une opération sous anesthésie pour modéliser la thrombose généralisée (thromboembolisme) sans réveil des animaux. Les résultats permettront d'expliquer la diminution de la numération plaquettaire sanguine de ces souris (durée de vie des plaquettes), mais également pourquoi celles-ci présentent une susceptibilité accrue aux saignements (thrombose locale). Ils permettront enfin d'évaluer si les souris sont susceptibles ou non aux thromboses disséminées, qui sont notamment la cause d'AVC ischémiques ou d'embolismes pulmonaires (thromboembolisme).

Réduction

Toutes les expériences mises en œuvre sont déjà maîtrisées dans notre laboratoire, de même qu'elles sont déjà décrites et publiées dans la littérature. Nous n'aurons aucune mise au point à réaliser, ce qui nous permet de réduire considérablement le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux est défini au plus près afin d'obtenir une analyse statistique fiable des données.

Raffinement

Une attention particulière est portée au bien-être des animaux afin de diminuer le stress et la douleur. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec des carrés de cellulose et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur

environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Les procédures douloureuses seront réalisées sous anesthésie et analgésie appropriées avec maintien de la température de l'animal pendant l'anesthésie. Elles seront toujours exécutées par du personnel formé.

#### Remplacement

La durée de vie des plaquettes ainsi que le phénomène d'hémostase reposent sur une multitude de facteurs (flux, vaisseaux sanguins...). Il n'est à ce titre pas possible de le modéliser ou de le reproduire *in vitro*.

Un total de 272 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

**19860** Les néoplasies myéloprolifératives (NMP) sont des maladies hématologiques caractérisées par une production excessive de cellules sanguines. Cela peut se traduire par une production excessive de plaquettes (on parle alors de thrombocytémie essentielle ou TE), de globules rouges (polyglobulie de Vaquez) et/ou de globules blancs. La majorité des cas de NMP est liée à l'acquisition de la mutation JAK2V617F. Les principales complications des NMP sont les thromboses. Ces thromboses surviennent le plus souvent dans les artères. Or les thromboses artérielles sont généralement la conséquence de la formation de plaques d'athérosclérose, elles-mêmes résultant d'une inflammation chronique. Ainsi nous émettons l'hypothèse que la mutation JAK2V617F favorise le développement de plaques d'athérome en provoquant une inflammation.

Nous proposons un projet de recherche sur 5 ans visant à étudier l'effet de la mutation JAK2V617F sur le développement d'athérome. Cette étude s'appuiera sur des modèles murins dans lesquels la mutation JAK2V617F est introduite dans différents types de cellules sanguines. Le développement d'athérome chez les souris sera induit selon un protocole associant l'utilisation de virus, de chirurgie et d'une alimentation riche en graisses. Nous étudierons différents marqueurs d'inflammation à partir de prélèvements sanguins par l'étude des cellules sanguines et des molécules solubles circulantes dans le sang. Nous étudierons également les plaques d'athérome elles-mêmes en recherchant les cellules impliquées dans leur formation et celles responsables de l'inflammation localement. La connaissance des mécanismes participant au développement d'athérosclérose au cours des NMP permettra d'adapter la prise en charge des patients et de proposer des thérapeutiques pour éviter ces complications.

Nous avons pensé ce projet de recherche en suivant la règle des 3 R «Remplacer, Réduire, Raffiner».

- Le remplacement : après des recherches bibliographiques, un modèle murin d'athérosclérose fiable et facilement réalisable a été sélectionné. Celui-ci permet de créer en 7 semaines de l'athérosclérose réduisant le temps de procédure et donc l'inconfort des animaux.

- La réduction du nombre d'animaux : nous nous sommes basés sur les études statistiques de la littérature montrant que nous devons constituer des groupes de 10 animaux par conditions afin d'obtenir des données exploitables. Le nombre maximum d'animaux nécessaire à cette étude a été calculé à 720. Les expériences ont été pensées afin que les prélèvements issus d'un seul animal puissent servir aux différentes analyses réalisées, limitant ainsi le nombre d'animaux que nous utiliserons.

- Le raffinement : l'hébergement des animaux permet de réduire le stress et l'inconfort (animalerie agréée, personnels formés, cage de 3 à 6 animaux maximum en portoir ventilé avec libre accès à l'eau et à la nourriture ainsi qu'un environnement enrichi avec igloo cartonné et carré de cellulose). Les animaux seront systématiquement anesthésiés lors des administrations intraveineuses et des prélèvements sanguins et nous utiliserons des analgésiques afin de limiter la douleur. Trois fois par semaine, nous évaluerons le bien-être des animaux à l'aide d'une grille d'Observation/Action qui nous permettra d'identifier les points limites et d'apporter dans les plus brefs délais la mesure adaptée à l'animal.



**19861** Le projet : La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive irréversible. C'est la première cause de démence chez la personne âgée. Les traitements actuels ne permettent ni de guérir ni même d'arrêter la progression de la MA. Au mieux, ils ralentissent l'évolution des symptômes. Afin de développer des traitements efficaces, il est aujourd'hui impératif de mieux comprendre la physiopathologie de la MA et d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques.

Sur le plan physiopathologique, le cerveau des patients MA est caractérisé par la présence de plaques amyloïdes, dues à l'accumulation extracellulaire du peptide beta amyloïde (Abeta), ainsi que des enchevêtrements neurofibrillaires, causés par l'agrégation de la protéine tau hyperphosphorylée. Dans les phases précoces de la MA, des anomalies d'élimination du peptide Abeta via la barrière hémato-encéphalique et le liquide cérébro-spinal pourraient être à l'origine de l'accumulation anormale et progressive de formes agrégées toxiques pour les neurones. Une meilleure compréhension des mécanismes expliquant les défauts de clairance cérébrale est donc nécessaire afin de développer des thérapies efficaces à un stade précoce. Plusieurs études soulignent que la suppression de l'action de facteurs de croissance sur les neurones ralentit la progression de la pathologie amyloïde et corrige les déficits cognitifs de souris modélisant la MA ; un des mécanismes protecteurs est une meilleure élimination du peptide Abeta hors du cerveau.

Ce projet cherche donc à identifier les mécanismes cellulaires par lesquels certains facteurs de croissance impactent le processus de clairance cérébrale des toxines au cours du vieillissement. Notre projet étudie des mécanismes intégratifs faisant appel à de nombreux types cellulaires (neurone, glie, système vasculaire), des interactions cerveau/système endocrines ainsi que les processus de vieillissement : il est donc indispensable d'avoir recours à l'animal entier. En particulier, nous allons analyser, dans le cerveau, le comportement de diffusion de molécules fluorescentes de taille comparable aux agrégats d'Abeta. Pour une évaluation 3D dynamique *in vivo* de la diffusion cérébrale, nous utiliserons l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Nous allons examiner les échanges entre parenchyme cérébral et liquide céphalo-rachidien (LCR). L'étude prévoit aussi l'utilisation de la microdialyse pour déterminer la vitesse d'élimination d'Abeta de l'espace extracellulaire. A terme, ces travaux visent le développement de thérapies préventives contre la MA en contrecarrant l'accumulation anormale d'agrégats protéiques toxiques à l'origine des déficits cognitifs.

Les animaux :

\* Type : Souris transgéniques immunocompétentes.

\* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 528 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 : Pour étudier les éléments mis en jeu dans le vieillissement cérébral et la pathologie Alzheimer, qui est au cœur de ce projet, il est indispensable d'avoir recours à l'animal entier. Il est pour l'instant impossible de recréer la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans un système artificiel, *in vitro*. Il est donc essentiel d'utiliser des modèles de souris knockout spécifique pour le gène d'intérêt ainsi que des souris modélisant la MA.

Là où c'est possible, nous préparons des banques d'organes pour avoir recours aux échantillons en stock et ainsi éviter systématiquement des expérimentations futures.

\* Réduction : Ce projet nécessite 528 souris sur 5 ans, le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. À cause des variabilités interindividuelles et intergroupes, qui augmentent avec l'âge, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats non valides.

Nous avons déterminé le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude, en tenant compte des données de la littérature et des effets statistiques. De plus, chaque animal est son propre témoin ce qui assure une réduction considérable du nombre d'animaux utilisés.

\* Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress par utilisation systématique de l'anesthésie, et recours à l'analgésie si nécessaire. 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 et d'abris 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.). Les définitions et critères pour arrêter les expériences excluent au maximum les douleurs.

**19862** La prévalence des stéatoses hépatiques non alcooliques (NASH) augmente considérablement dans le monde entier. Des infiltrats inflammatoires, des ballonnets hépatocytaires et de la fibrose peuvent être observés, augmentant le risque d'atteindre les stades les plus sévères, à savoir la cirrhose et le carcinome hépatocellulaire. Parallèlement à l'augmentation du niveau d'urbanisation, l'inactivité physique et la consommation d'aliments riches en énergie contribuent à augmenter la prévalence de la NASH. L'augmentation de l'apport alimentaire en fructose par la consommation d'aliments et de boissons transformés est également soupçonnée d'être un contributeur majeur à la NASH, en raison de l'effet stimulant du fructose sur la lipogénèse hépatique. Des différences substantielles dans le métabolisme des lipides et des lipoprotéines existent chez les souris et les rats par rapport à l'homme, précisément le manque de la protéine de transfert des esters de cholestérol. Cette protéine joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol humain et modifie le profil des lipoprotéines car elle transfère le cholestérol des lipoprotéines de haute densité (HDL) aux particules de lipoprotéines de très basse densité et de basse densité (VLDL et LDL). Contrairement à la souris et au rat, le hamster syrien doré exprime cette protéine. Par conséquent, ce modèle animal reproduit mieux le métabolisme des lipoprotéines humaines et est plus prédictif pour évaluer les effets des médicaments sur le métabolisme des lipoprotéines.

Ne pouvant étudier les conséquences d'un régime riche en graisse et en sucre dans un système de culture cellulaire, le modèle hamster est un outil de référence pour l'étude des mécanismes impliqués dans les NASH lorsqu'il est soumis à un régime riche en graisse et en sucre.

Dans cette étude, les hamsters auront le choix entre un régime riche en graisse (55% d'aliment standard + 25% pâte à tartiner + 0.5 % cholestérol) ou standard et une boisson sucrée (10% de fructose) ou standard sur une durée de 34 semaines maximum, afin d'étudier les préférences, la prise de poids et le développement d'une NASH. L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 3000 sur 5 ans.

La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Nous réalisons le protocole alimentaire à la demande de notre client. Le nombre d'animaux est calculé selon son protocole expérimental. Les animaux seront hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement (bouts de bois à ronger). Une surveillance des animaux est réalisée quotidiennement 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 du bien-être animal.

Ce projet est classé en degré modéré.

**19863** Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le cancer primitif du foie le plus courant. C'est la 5ème cause de cancer dans le monde et la 3ème cause de mortalité par cancer.

Il survient dans la grande majorité des cas sur un foie qui est déjà endommagé par une maladie chronique et présente une cirrhose. Les causes les plus fréquentes sont le virus de l'hépatite B, le virus de l'hépatite C, l'intoxication alcoolique et la stéatose hépatique non alcoolique (NASH). Le

diabète et l'obésité peuvent aussi entraîner l'apparition d'un CHC. Le CHC sur foie totalement sain existe mais il est resté rare.

Les carcinomes hépatocellulaires portant une mutation sur le gène de la  $\beta$ -caténine, sont caractérisés par une cholestase. La cholestase est une diminution ou un arrêt de la sécrétion biliaire entraînant un défaut de transport des acides biliaires du foie vers les intestins. Ce phénomène a pour conséquence une augmentation des concentrations sériques et tissulaires des acides biliaires. Par une étude de l'ensemble des ARN messagers produits lors du processus de transcription du génome, nous avons identifié la Fascine comme cible de la  $\beta$ -caténine. Nous avons mis en évidence, *in vitro*, l'impact de l'expression de la Fascine sur la formation des canalicules biliaires, structures caractéristiques des hépatocytes polarisés où est sécrétée la bile.

Notre projet vise à mieux comprendre l'implication de la Fascine dans la formation et le maintien des canalicules biliaires et dans la survenue des cholestases associées à certaines maladies du foie.

Le recours au modèle animal est indispensable à ce projet afin de confirmer les résultats obtenus *in vitro*. Nous souhaitons étudier l'impact de l'expression de la Fascine sur la formation des canalicules biliaires. *In vivo* nous pourrions exprimer la Fascine dans le foie de souris et analyser l'impact sur l'architecture des canalicules biliaires. Pour cela, nous allons utiliser la technique d'administration hydrodynamique de gènes par injection rapide d'une solution d'ADN dans les cellules de petits animaux. Cette méthode efficace et utilisée pour les études de thérapie génique est reconnue par la communauté scientifique depuis plusieurs années. Des mesures de surveillance seront réalisées par les intervenants et le personnel de l'animalerie, des points limites spécifiques et adaptés seront mis en place. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 90 animaux. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoin dans le but de restreindre le nombre d'animaux. 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'anesthésiques en pré opératoire, mesure hebdomadaire, définition de points limites suffisamment précoces et mise en place de critères d'arrêt)." Le test statistique utilisé sera le test ANOVA (test très généralement utilisé pour ces études).

**19864** 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 multifactorielle, 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 donc une meilleure compréhension des mécanismes associés à cette pathologie. 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.

Il est supposé que des expositions à des molécules environnementales (pollution, médicaments) pourraient participer aux processus de la tumorigenèse testiculaire. Cependant à ce jour, les liens restent peu établis et source de débat. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles pertinents pour reproduire les CT dans leur complexité au cours des étapes d'initiation, de leur développement et de leur sensibilité aux traitements anti-cancéreux.

Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur l'analyse de l'initiation, de la progression des CT grâce à l'utilisation d'un modèle expérimental de souris développant spontanément des tumeurs. Cette analyse sera faite par une étude cinétique du développement tumoral à partir de la naissance et jusqu'à 2 mois postnatal. Cela permettra de suivre l'ensemble des étapes du processus tumoral dont la réponse aux traitements par chimiothérapie.

Certains groupes de souris seront traités avec des cycles de chimiothérapie. Cela permettra de définir des acteurs de chimiorésistance qui seront clés dans l'amélioration des traitements actuels.

Ce projet mobilisera environ 1800 souris sur 5 ans afin de générer, entretenir et réaliser les expériences sur ce modèle expérimental de CT.

Le projet nécessite de travailler sur l'animal entier pour appréhender les étapes d'initiation, du développement et de la sensibilité aux traitements des cancers des cellules germinales du testicule. Malheureusement, il n'existe pas à l'heure actuelle de modèles pertinents pour reproduire la pathologie dans sa complexité qui permettrait de remplacer l'utilisation des modèles murins.

Cependant l'ensemble de ce projet s'intègre au mieux dans le respect de la règle des 3R. 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. Cela reposera d'un part sur l'établissement de points limites adaptés (perte de poids, masse de la tumeur ou une ulcération à l'emplacement de la tumeur) et associés à un arbre décisionnel qui permettra l'arrêt de l'expérimentation pour éviter la souffrance animale, tout en permettant d'assurer l'obtention de données valides. D'autre part, nous réaliserons 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. »

**19865** L'ostéoarthrose est une affection qui touche toutes les espèces d'animaux à sang chaud. Elle consiste en une dégradation du cartilage des articulations, son usure, voire sa disparition, qui permet ensuite l'usure et la lésion de l'os sous-chondral. Cette dégradation entraîne une perte d'élasticité des articulations et une douleur chronique. Chez le Cheval, elle peut être provoquée par le vieillissement, mais elle est favorisée par les efforts demandés lors des activités sportives pratiquées avec les équidés. Elles peuvent mener à une perte de performance, une gêne, voire elles peuvent mener à la fin de carrière de chevaux de sport ou de travail. Les traitements médicamenteux connus consistent à réduire la douleur pour certains, et pour d'autre, à limiter la dégradation du cartilage articulaire., mais rarement à permettre sa cicatrisation. Notre équipe participe à un programme de recherche qui développe un procédé qui consiste à appliquer un traitement innovant directement sur les lésions articulaires graves. Ce procédé a déjà été testé *in vitro*, puis chez la souris et le porc et il a montré qu'il est bien toléré et que les cellules du cartilage colonisent les lésions et ainsi les cicatrisent. Il nous est paru important de pouvoir tester ce traitement sur des lésions d'arthrose focalisées en reproduisant les blessures observées chez les chevaux de sport.

Comme l'arthrose et la physiologie des cellules du cartilage sont des phénomènes complexes, où l'environnement tissulaire, les pressions et les chocs ne sont pas reproductibles, il est nécessaire de pratiquer ces tests avec des animaux vivants.

Comme l'espèce cible est le cheval, nous devons tester ce traitement sur ces animaux. Notre essai est conçu pour utiliser le nombre minimum de chevaux pour obtenir des informations sur la qualité du cartilage après le traitement des lésions d'arthrose qui auront été provoquées sous anesthésie générale, par voie arthroscopie mini invasive. Le nombre optimal est de 6 chevaux. Ces animaux seront issus d'autres projets de recherche, dont la gravité est considérée comme légère à modérée, et ils seront gardés en vie à la fin de notre protocole, pour être proposés au placement. Durant toute l'expérimentation, ces chevaux seront hébergés dans des conditions équivalentes à celles d'un centre équestre : dans des paddocks avec abris, ou dans des boxes, en fonction des phases de l'essai. Le traitement expérimental sera réalisé sous anesthésie générale et si des douleurs articulaires apparaissent, un traitement de la douleur sera systématiquement mis en place et suivi. Les soins seront apportés par du personnel spécialisé dans la prise en charge des chevaux. Ils sont maintenus en groupes sociaux, dans des paddocks avec des abris confortables, avec paille et foin à volonté.

Notre projet s'efforce d'être conforme à la règle des 3R :

Remplacement : ce traitement a déjà été testé *in vitro*, et il est déjà utilisé chez l'Homme. Cette courte phase *in vivo* chez le cheval nous permettra de savoir si le produit est utilisable chez les chevaux présentant des lésions d'arthrose. Si l'étude donne de bons résultats, il n'y aura pas d'autre étude *in vivo*.

Réduction : nous multiplions les petites lésions sur une même articulation pour obtenir 5 résultats par cheval. Ainsi nous pouvons obtenir suffisamment de données avec 6 chevaux, sans pour autant augmenter la souffrance des chevaux.

Raffinement : les essais sont réalisés dans un hôpital spécialisé dans le soin des chevaux, avec un encadrement spécialisé. En période post-opératoire, et pendant les phases de repos, les chevaux sont soignés et hébergés comme tous les autres chevaux d'un club hippique. Ils vivent en groupe, et sont pansés régulièrement.

**19866** Les monocytes du sang périphériques peuvent être stimulés par des  $\beta$ -glucanes extraits de différents organismes. Cette stimulation entraîne une reprogrammation épigénétique des monocytes et une mémoire à moyen terme qui leur permet de mieux répondre à de nouveaux pathogènes. Ce mécanisme est appelé 'entraînement immunitaire'. Nous nous proposons de tester différents extraits contenant des  $\beta$ -glucanes, afin de déterminer leur capacité à entraîner les monocytes de sang périphérique. Pour cela il nous faut régulièrement du sang de porc frais afin d'isoler les monocytes et de les cultiver *in vitro* en présence de ces extraits.

Les extraits sélectionnés pourront être ensuite utilisés (commercialisés) comme immunostimulants aidant à la bonne santé des animaux d'élevages, et à la baisse de l'utilisation d'antibiotiques.

Concernant la règle des 3R:

Réduire: 12 cochettes seront nécessaires pour prendre en compte les variabilités inter-individuelles et les variabilités intra-expérience. 6 cochettes seront ajoutées dans le cadre d'un avenant pour palier des problèmes de contaminations sur les premiers animaux et nous permettre de confirmer des résultats très intéressants. Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet sera donc de 18 animaux.

Raffiner: les animaux sont hébergés en groupe dans des loges sur caillebottis équipés de chaînes et balles (jouets) avec accès à l'eau ad libitum et nourriture matin et soir. Ils ont accès à une zone de repos propre distincte de la zone d'alimentation. Les interventions seront réalisées dans le calme dans un souci du bien être animal et dans le but de diminuer au maximum la douleur.

Les animaux sont manipulés par des animaliers compétents, habitués à cette procédure et les animaux recevront une récompense alimentaire après l'intervention.

Remplacer: la substitution des porcs dans cette expérimentation n'est pas possible puisque c'est pour cette espèce que nous souhaitons identifier des molécules capables de stimuler "l'entraînement immunitaire" pour diminuer les antibiotiques.

**19867** Les macrophages sont des cellules immunitaires innées qui résident essentiellement dans tous les tissus de l'organisme et sont importantes pour leur développement, leur homéostasie, leur métabolisme, leur réparation et leurs fonctions immunitaires. Il n'y a pas si longtemps, on pensait que tous les macrophages avaient un temps de vie assez court et qu'ils étaient produits à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC) auto-renouvelables. Depuis ce point de vue a changé. Pour l'instant, nous savons que les progéniteurs embryonnaires issus du sac vitellin peuvent donner naissance à des macrophages résidents dans les tissus qui ont la capacité de se renouveler de façon autonome. Les macrophages sont essentiels à la défense de l'hôte et à l'élimination des agents pathogènes pendant l'infection. Plus récemment, ils ont également été reconnus comme essentiels dans les processus régénératifs. Par exemple, la capacité limitée des mammifères à régénérer certains organes tels que le foie et le cœur du nouveau-né dépend des macrophages. Cependant, la propriété de l'auto-renouvellement diminue avec l'âge, ce qui peut contribuer à une inflammation prolongée, à la formation de cicatrices et à la perte de capacités régénératrices. Les

régulateurs clés qui contribuent à l'auto-renouvellement prolongé ou qui sont impliqués dans le vieillissement ou le vieillissement cellulaire seront étudiés.

Dans notre étude, nous nous concentrerons sur les macrophages du poumon résidents dans les tissus. Les macrophages alvéolaires (AMs) forment 90-95% du contenu cellulaire des alvéoles dans des conditions normales, ce qui en fait les "gardiens" naturels du système respiratoire. Chez la souris, les cellules monocytaires fœtales qui peuplent les poumons pendant l'embryogenèse précoce se différencient en macrophages alvéolaires peu après la naissance. Cette population de macrophages alvéolaires "résidents dans les tissus" vit longtemps et peut se renouveler d'elle-même dans des conditions homéostatiques. Cependant, l'exposition aux défis environnementaux, y compris les virus, la pollution de l'air et la fumée de cigarette au cours de la vie peut induire le recrutement de monocytes qui se différencient en macrophages alvéolaires en réponse aux signaux fournis par le microenvironnement tissulaire local du poumon. Avec le temps, ces macrophages alvéolaires dérivés de monocytes peuvent persister dans les poumons et/ou remplacer les macrophages alvéolaires résidant dans les tissus. Nous aimerions étudier la dynamique de la population de macrophages résidents et sa contribution à partir de cellules ontogéniques distinctes provenant de lésions pulmonaires, leurs signatures génétiques distinctes, le rôle mécaniste de plusieurs facteurs de transcription et molécules affectant la prolifération locale, la sénescence cellulaire et le vieillissement des macrophages alvéolaires résidents des tissus pendant le processus de régénération pulmonaire. L'identification de ces facteurs clés pourrait s'avérer importante pour l'amélioration de la fonction immunitaire et la guérison de diverses lésions pulmonaires et du vieillissement pulmonaire.

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. Ne pouvant donc pas remplacer le modèle murin, nous réduirons autant que possible leur utilisation.

**Réduction :** Pour chaque procédure nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaires pour réaliser des tests statistiques paramétriques, soit un total de 7 158 souris. Pour limiter le nombre d'animaux nous utiliserons des souris mâles et femelles.

**Raffinement:** Les expérimentations seront optimisées dans l'optique de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les souris. 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. En cas de signes de douleur modérée, un anti-douleur sera administré (Buprénorphine). 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. Le nombre d'animaux nécessaires pour l'expérimentation sur 5 ans, prenant en compte 10 lignées différentes décrites dans l'annexe, s'élève à 7 158 animaux.

**19868** Le choc septique est la première cause de mortalité en réanimation avec un taux avoisinant les 40%. L'immunité innée constitue la première ligne de défense de l'organisme contre les pathogènes. Les plaquettes jouent un rôle déterminant dans les défaillances d'organes lors du sepsis et la chute du taux de plaquettes est un facteur prédictif de mortalité. Outre leur caractère pro-thrombotique, elles sont des acteurs de l'immunité et permettent le recrutement et l'activation de cellules

nécessaires à la réponse inflammatoire de l'organisme contre le pathogène. Cette action n'est pas sans conséquence puisqu'elles sont responsables de lésions tissulaires via l'apparition d'occlusions des microvaisseaux pouvant mener à une dysfonction d'organe.

L'inflammasome est un complexe multiprotéique intracytoplasmique activé par des stress cellulaires ou des infections et est responsable de la libération de cellules pro-inflammatoires. Récemment, une étude s'est intéressée à un type principal d'inflammasome chez des patients souffrant de sepsis d'origine digestive. Les résultats retrouvent une altération précoce de l'inflammasome qui est corrélée avec la mortalité.

La plupart des travaux retrouvés dans la littérature ont étudié l'inflammasome présent au sein des cellules nucléées et très peu ont exploré l'inflammasome au sein des plaquettes.

On retrouve ainsi une seule étude récente chez l'animal, démontrant une activation de l'inflammasome dans les plaquettes chez des rats ayant subi une ponction ligature du colon. Cette activation est associée à l'inflammation, l'augmentation de la perméabilité vasculaire et la défaillance multi-viscérales.

En revanche, il n'existe aucune étude ayant analysé l'activation et le rôle de l'inflammasome plaquettaire dans le choc septique chez la souris.

Ainsi, notre travail vise à étudier l'activation de l'inflammasome plaquettaire et leucocytaire dans un modèle de souris septiques.

Pour cela, notre expérimentation animale va intégrer un total de 192 souris, séparées en 4 groupes équitablement. Les groupes de 1 à 3 comporteront chacun 24 souris avec ponction, ligature caecale et 24 souris contrôle. Le groupe 4 comportera 48 souris avec ponction, ligature caecale. Les souris des groupes 2 à 4 bénéficieront d'une administration médicamenteuse ou d'une mutation altérant l'activation de l'inflammasome.

Dans le but de respecter le principe des 3R, nous envisageons:

- la réduction : par la limitation du nombre d'animaux utilisés en ne répétant pas les expérimentations d'études antérieures et nous feront seulement les expériences considérées comme indispensable en fonction des résultats obtenus au fur et à mesure de l'avancement du projet. De plus, nous obtiendrons plusieurs résultats à partir d'un seul animal et nous analyserons précocément les premières données afin de définir le nombre de souris minimum nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement significatifs.

- le remplacement : les effets pléiotropes font intervenir des fonctions cellulaires multiples dans l'organisme non modélisables par des approches artificielles. Le recours à l'expérimentation animale est donc l'unique approche permettant de comprendre les impacts physiopathologiques du sepsis. Par ailleurs, nous travaillons avec des souris génétiquement modifiées de façon à améliorer la compréhension de la physiopathologie du sepsis et de détailler précisément les voies d'activation de l'inflammasome.

- le raffinement : afin de permettre ces expérimentations dans les meilleures conditions, toutes les souris bénéficieront d'une anesthésie générale lors des gestes invasifs potentiellement douloureux. Il sera également associé systématiquement une analgésie post-opératoire. Toute détection de signes douloureux chez la souris, de type prostration ou poils hérissés, entraînera son euthanasie immédiate. Toutes les souris seront hébergées dans une animalerie avec des conditions de vie adaptée. Leurs états de santé seront surveillés quotidiennement jusqu'à la fin de la procédure.

Cette étude permettrait pour la première fois d'analyser l'implication de l'inflammasome présent au sein des plaquettes dans un modèle de souris au cours du sepsis. Ainsi, en cas d'altération des voies de l'inflammasome, un ciblage thérapeutique de la cascade de signalisation intra-cellulaire pourrait éventuellement être envisagée. Cela constituerait une piste de recherche prometteuse dans le traitement du sepsis en limitant l'activation de l'inflammasome. Si une corrélation est démontrée entre une activation accrue de l'inflammasome plaquettaire chez la souris septique et la sévérité clinique du sepsis, dont la mortalité, nous pourrions valider des marqueurs biologiques de sévérité. Il sera possible, alors, de suivre l'évolution de la maladie et d'évaluer la réponse au traitement.

**19869** Les lésions médullaires traumatiques sont des atteintes physiques entraînant une perte des fonctions sensorielles et/ou motrices. Actuellement aucune thérapie efficace n'existe, cependant l'une des pistes thérapeutiques les plus prometteuse est la transplantation cellulaire permettant une récupération partielle des fonctions chez certains patients. Dans un contexte médical, la plupart des transplantations sont réalisées de manière autologue (les cellules sont récupérées à partir d'un organisme ayant subi un traumatisme) or en recherche fondamentale, la plupart des thérapies étudiées le sont par allogreffe : les cellules sont récupérées sur une autre animal, souvent sain. C'est pourquoi nous proposons de comparer l'impact de la lésion et de mesurer l'efficacité de la transplantation de cellules différenciées, les cellules gliales olfactives (CGO) puis dans un second temps sur des cellules souches, les cellules souches issues du tissu adipeux (ADSC). La transplantation de CGO est actuellement l'une des thérapies les plus efficaces, cependant les résultats varient d'un patient à l'autre c'est pourquoi il est important de comprendre les facteurs influençant la différence de récupération entre ces patients. La transplantation d'ADSC est une thérapie émergente pour les lésions médullaires. L'efficacité de leur transplantation après lésion a été démontré aussi bien chez l'animal que chez l'Homme. La facilité d'obtention de ces cellules, leur efficacité et leur caractère souche font de ces cellules des candidats intéressants pour soigner les lésions médullaires. Ce projet a pour but de mettre en évidence les conséquences tissulaires (cérébrale et périphérique) suite à une lésion médullaire puis d'évaluer la qualité des cellules prélevées suite à cette lésion, pour la réalisation de thérapie cellulaire après lésion médullaire.

Pour cela 284 souris femelle et mâle mixées au sein des groupes à hauteur de 50 - 50% seront utilisées : 248 souris wild type, 20 Foxj1-Tomato (animaux permettant de suivre les cellules souches endogènes de la moelle épinière, les cellules épendymaires), 12 TdTomato (Souris exprimant de manière continue le gène tdTomato permettant un suivi dans le temps des cellules transplantées) et 4 luciférase+ (Souris émettant des photons après injection de luciférine permettant un suivi des cellules transplantées au travers de l'animal sans mise à mort). Quatre groupes d'études seront constitués, un groupe sain, un groupe contrôle ayant une lésion médullaire mais ne recevant pas de thérapie cellulaire, un groupe ayant une lésion médullaire et recevant des CGO provenant d'animaux sains et un groupe ayant une lésion médullaire et recevant des CGO provenant de souris 7 jours après lésion médullaire. Ces groupes seront respectivement constitués de 5, 45, 75 et 75 souris servant de modèle de lésion médullaire/transplantation pour l'ensemble des analyses, soit 190 souris de 6-8 semaines. L'ensemble de ces animaux permettra l'exploration moléculaire, cellulaire, tissulaire, fonctionnelle et cognitive à 7, 15, 30 et 60 jours après la lésion médullaire et transplantation. La mise en place des cultures de CGO et d'ADSC nécessitera le prélèvement des bulbes olfactifs de 94 souris. Un nombre minimum d'animaux sera donc inclus dans chaque groupe afin de permettre une étude statistique fiable. Les expériences ont été optimisées afin de récupérer le maximum d'échantillons à partir d'un animal et ainsi de réduire le nombre de souris nécessaires. L'utilisation de méthode d'imagerie permettant un suivi cellulaire sans mise à mort de l'animal sera utilisée. Les souris seront opérées sous anesthésie générale et un protocole d'analgésie en pré-opératoire et post-opératoire sera mis en place. 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 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'antalgies et les méthodes utilisées seront adaptées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durable que pourraient ressentir les animaux de manière à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux conformément aux normes actuelles encadrant l'éthique animale. Les animaux seront toujours entre 3 et 5 par cages et leur environnement sera enrichi en coton, carton et tunnel afin d'améliorer leur condition de vie. Ces derniers seront observés quotidiennement durant toute la durée du protocole expérimental. Nous mettrons en place des points limites basés sur différents critères objectifs (expressions faciales de la souris, perte de poids importante, etc.). Une analgésie morphinique sera utilisée pendant 1 semaine après la lésion médullaire afin de diminuer la douleur liée à l'opération puis les semaines suivantes les animaux disposeront de paracétamol dans leur eau de boisson. Tout signe de souffrance extrême entraînera l'euthanasie des animaux.



Concernant les 3R et le respect de d'éthique, concernant l'expérimentation animale :

Et plus particulièrement, pour la partie Raffinement, les animaux sont hébergés aux normes requise, par la réglementation, un enrichissement spécifiques des cages est mis en place, concernant cette DAP.

Des points limites adaptés sont mis en place, les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été revues et un suivi de chaque animal au quotidien est mis en place, ainsi qu'en parallèle une notation précise de l'évolution de chaque animal dans un registre papier, prévu à cet effet.

Pour le R de réduire, nous avons optimisé le nombre d'animaux par groupe, afin d'avoir le meilleur ratio pour les statistiques. Le protocole opératoire à également été optimisé, afin de limite au maximum la mortalité post-opératoire.

Concernant, le R de remplacement, nous travaillons également sur l'étude de modèle basé sur la biologie moléculaire *in vitro*. Cependant l'étude spécifique, sur la lésion de moelle épinière sur un modèle animal "*in vivo*" est toujours primordial et indispensable, afin de démontrer certaines thèses ou concepts.

**19870** Les mélanomes cutanés, issus de la transformation maligne des mélanocytes, sont parmi les cancers humains les plus agressifs et résistants aux traitements. Le risque élevé associé aux mélanomes est leur grande propension à former des métastases à un stade précoce. Malgré le développement d'inhibiteurs ciblés et d'immunothérapies, 30 à 50% des patients à un stade avancé ne répondent pas aux traitements, soulignant le besoin accru de rechercher des cibles thérapeutiques alternatives. Il est maintenant bien établi que les tumeurs de mélanomes sont très hétérogènes, et comprennent des cellules avec des propriétés invasives, prolifératives et tumorigènes différentes.

Notre projet se focalisera sur le rôle d'un régulateur épigénétique dans les cellules de mélanome différencié (dépigmenté) qui sont à l'origine des résistances aux traitements et des métastases. De précédents travaux de notre laboratoire ont montré l'importance de ce régulateur épigénétique dans la survie et la prolifération des mélanomes de type différencié/pigmenté. L'objectif de la présente étude est d'étudier le rôle du gène d'intérêt dans la croissance tumorale ainsi que la formation de métastases dans des souris immunodéprimées en utilisant des modèles cellulaires dérivés de patients.

**REPLACEMENT** : Nous avons démontré le rôle essentiel de notre gène d'intérêt dans la croissance tumorale de cellules de mélanomes *in vitro*. Toutefois, ce modèle a des limites et ne tient pas compte du rôle du microenvironnement qui entoure la tumeur. Ces caractéristiques ne peuvent être récapitulées que par un modèle *in vivo*, c'est-à-dire par injection sur des souris déficientes en système immunitaire.

**REDUCTION** : Le nombre total de souris expérimentales sera de 69. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaires afin que les résultats obtenus soient exploitables, reproductibles et statistiquement valides. Notre étude comprends un projet-pilote qui permettra de vérifier si les lignées cellulaires sont bien tumorigènes sur un lot initial de 9 souris, avant de continuer sur les 60 souris nécessaires à la validation des hypothèses.

**RAFFINEMENT** : Nous mesurerons les différences de croissance tumorale dans les différentes conditions à 4 semaines (ou lorsque la tumeur aura atteint un volume maximal de 1cm<sup>3</sup>). En outre, toutes les lignées ont été modifiées pour émettre un signal luminescent qui pourra être détecté par imagerie afin de suivre la progression des tumeurs. Nous suivrons journalièrement l'état des souris après injection des lignées tumorales afin de détecter tout effet dommageable. Les souris seront hébergées en cohorte afin de conserver l'interaction sociale. Nous utiliserons que des femelles pour éviter tout dommage liés aux comportements conflictueux. En cas de souffrance liée au phénotype, les animaux seront suivis régulièrement et des points limites appliqués le cas échéant.

## 19871 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

o 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 *in 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...).

o 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.

o 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

o 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.

o par la planification des études pour garantir un hébergement optimal des animaux, la disponibilité des salles d'expérimentation...

o La douleur infligée sera réduite au minimum : Les composés étudiés n'auront pas montré d'effet toxique dans des modèles *in 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

o 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.

**19872** Dans le cadre de cette demande, nous souhaitons aborder les conséquences physiologiques de la perte de fonction d'un gène non-codant, nommé ci-après ARNnc. Cette étude fonctionnelle *in vivo* fait intervenir la souris comme modèle d'étude. C'est une souris knockout (KO).

La fonction de cet ARNnc n'est pas comprise. Néanmoins, la perte de la fonction de son homologue humain apparaît liée à une maladie associée à de graves troubles de comportement ainsi qu'à des dysfonctionnements métaboliques dont une obésité morbide. A travers le monde, les modèles murins de ce syndrome sont tous réalisés chez la souris, dans le fond génétique C57Bl/6J, particulièrement bien adapté pour les analyses comportementales et métaboliques. D'autre part, le gène de cet ARNnc est conservé uniquement chez les mammifères placentaires et son expression est marquée, pour ne pas dire exclusivement retrouvée dans les neurones. A ce jour, il n'existe pas de système cellulaire pertinent permettant d'aborder sa fonction moléculaire. La souris paraît le modèle de choix.

Cette demande concerne des expériences qui s'inscrivent dans la poursuite d'un programme de recherche qui a déjà reçu des autorisations. Elle s'articule autour de trois types d'expérimentations:

- 1) Mesurer l'activité des neurones sérotoninergiques et dopaminergiques dans les souris KO.
- 2) Analyser le comportement motivationnel des souris KO.
- 3) Analyser la réponse métabolique des souris KO suite à un jeûne.

Les expériences proposées sont classiques et maîtrisées par les membres des équipes participant à ce projet. Cette étude nécessitera 176 souris pendant une période de 3 ans. Cette estimation correspond à la fourchette haute et prend en compte l'ensemble des expériences envisagées. Il va sans dire que nous limiterons le nombre des animaux utilisés en fonction des résultats. Les animaux seront observés quotidiennement afin de repérer des anomalies, notamment en termes de comportement général, de prise (perte) de poids ou d'apparence. Lorsque nous tenterons de corriger les anomalies de notre modèle murin en réintroduisant le gène défectueux par injection ; ceci nécessitera une chirurgie sur les animaux. Ils seront surveillés jusqu'au réveil puis quotidiennement à la recherche de signes d'infection ou de douleur. Les animaux présentant de tels symptômes sont traités (anti-inflammatoires et/ou antibiotiques) puis euthanasiés sur avis du responsable du «Bien-être animal» si les symptômes persistent.

**19873** La peur est une émotion provoquée par l'exposition à une menace réelle ou figurée, qui permet d'adapter son comportement afin d'éviter cette menace et d'y survivre. La mémoire de peur enregistre les épisodes provoquant ce sentiment de danger afin d'y répondre plus efficacement, s'ils devaient se reproduire. Il s'agit d'un processus acquis au cours de l'évolution, nécessaire à la survie et à la prospérité des êtres vivants.

Cependant, des perturbations lors de la formation de la mémoire de peur peuvent conduire à des réponses comportementales inadaptées voire à des pathologies psychiatriques telles que les phobies, le syndrome de stress post-traumatique ou encore les troubles d'anxiété. Ainsi, il est nécessaire de comprendre les fondements moléculaires et cellulaires de la mémoire de peur en l'absence de pathologie. Ceci permettra de construire une base solide de connaissances pour répondre aux anomalies affectant la mémoire de peur.

Dans le cerveau, de nombreux neurotransmetteurs orchestrent la formation de la mémoire. Parmi eux, l'histamine joue un rôle crucial dans l'acquisition de la mémoire de peur. En effet, les neurones histaminergiques sont organisés en circuits fonctionnels reliant les structures cérébrales essentielles à la mémoire entre elles, telles que l'amygdale, le cortex préfrontal et l'hippocampe. Cependant, les processus moléculaires permettant le fonctionnement de ces circuits au cours des différentes étapes de formation de cette mémoire sont peu connus.

Dans ce contexte, le but de ce projet est d'évaluer les conséquences de l'activation ou bien de l'inhibition des neurones histaminergiques sur la mémoire de peur, à l'aide de la tâche de l'évitement passif, connue pour évaluer cette mémoire chez la souris.

Ce projet s'étendra sur 3 ans, et nécessitera l'utilisation de souris transgéniques et non-transgéniques pour la mise au point du protocole optimal d'évaluation de la mémoire, les deux technologies de manipulation de l'activité neuronale (activation et inhibition) ainsi que l'évaluation de leurs conséquences moléculaires. Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 730 souris C57BL6/J, dont 180 non-transgéniques et 550 transgéniques.

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 de bien-être des animaux (règle des 3R), appliqués dans notre équipe de recherche : accès à l'eau et à la nourriture en continu, enrichissement et raffinement des cages d'hébergement, suivi du maintien de température et d'hygrométrie, surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux. Afin de réduire au maximum la souffrance causée aux animaux, nous avons déterminé avec attention les points limites de chaque procédure, nous permettant le cas échéant d'administrer des antidouleurs.

Ce projet impose l'utilisation de modèles animaux (souris) en raison des aspects comportementaux qui ne sont pas modélisables *in vitro* ou *in silico*.

Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre et la souffrance des animaux utilisés afin d'éviter les répétitions inutiles.

Ce projet s'inscrit dans la perspective à long terme de faciliter le développement de stratégies préventives et thérapeutiques à l'égard des troubles de la mémoire de peur chez l'Homme.

**19874** Depuis Décembre 2019, un nouveau coronavirus nommé SARS-CoV-2 a émergé et s'est rapidement répandu dans le monde entier, devenant une pandémie. La maladie engendrée par ce virus a été nommée COVID-19 (Coronavirus disease 19). L'organisation mondiale de la santé a déclaré la COVID-19 comme une urgence de santé publique mondial en Janvier 2020. A ce jour, la COVID-19 est responsable de 860 000 morts dans le monde dont plus de 30 000 en France. Il n'y a actuellement aucun traitement spécifique ni de vaccin pour prévenir ou traiter l'infection et la transmission de ce virus, ce qui entraîne une grande urgence dans la recherche d'un traitement antiviral ou d'un vaccin.

Ce projet a pour objectif n°1 d'évaluer l'efficacité antiviral de composés chez la souris ou le hamster infectés avec le virus SARS-CoV-2. Cet objectif est décrit dans la procédure N°1.

Un 2ème objectif de ce projet sera d'évaluer des thérapeutiques dans un modèle d'infection par le virus SARS-CoV-2 co-infecté par un agent bactérien. Cet objectif est décrit dans la procédure N°2.

Un 3ème objectif sera d'évaluer l'efficacité antiviral de composés chez la souris ou le hamster infectés avec le virus SARS-CoV-2 en intégrant un paramètre de suivi de la survie. Cet objectif est décrit dans la procédure N°3.

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 l'infection dans un organisme entier et ainsi de tester l'efficacité de composé antiviral entraînant de multiples interactions cellulaires et moléculaires. Pour la souris, le modèle choisit est la souris transgénique K18-hACE2 car elle exprime le récepteur hACE2 (human angiotensin-converting enzyme 2) qui correspond au récepteur d'entrée dans les cellules du virus SARS-CoV-2. D'autres souches de souris pertinentes pour l'étude de la pathologie, en fonction de l'évolution des connaissances sur ce pathogène, pourraient également être utilisées si besoin. Pour le hamster, le modèle choisit est le Hamster Golden Syrian. D'autres souches de hamster pertinentes pour l'étude de la pathologie pourraient également être utilisées si besoin, en fonction de l'évolution des connaissances sur ce pathogène.

Des suivis cliniques et des pesées corporelles seront réalisés au minimum environ 3 fois par semaine afin de détecter tous signes cliniques anormaux. Toute anomalie clinique observée sera rapportée au personnel responsable du projet ou à un vétérinaire si nécessaire dans le but de

réaliser un examen clinique plus approfondi. Si possible des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférer sur l'étude en cours (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.). Des critères d'interruption ou « points limites » ont été définis en fonction des procédures et seront appliqués tout au long de ces études.

Lors de ce projet 15 études d'efficacité antiviral contre SARS-CoV-2 par espèce pourront être réalisées afin de tester plusieurs composés. Pour chaque étude, 70 animaux pourront être utilisés. Au maximum, un total de 2100 animaux pourra être utilisé pour l'ensemble du projet (1050 souris et 1050 hamsters).

Ce projet pourra permettre de mettre sur le marché un traitement antiviral prophylactique ou thérapeutique contre la COVID 19.

**19875** Le denti (*Dentex dentex*) et le corb (*Sciaena umbra*) sont deux espèces de poissons côtiers européens, emblématiques de la Méditerranée, qui sont très largement exploités par la pêche récréative et professionnelle. A ces deux espèces correspondent ainsi un statut « Vulnérable » (VU) sur la liste rouge UICN (Union Internationale pour la Conservation de la Nature) depuis 2011 pour la Méditerranée. Au niveau mondial, le denti est également classé « Vulnérable » (VU) contrairement au corb, classé « Quasi-menacé » (NT, Near Threatened en anglais).

Alors que le denti n'est pas sujet à des restrictions quelconques sur les captures en France (e.g. taille minimale de débarquement MLS, calendrier de capture), le corb est interdit à la pêche récréative (pêche à l'hameçon et chasse sous-marine) dans les eaux maritimes corses jusqu'en 2023 (arrêté n°R20-2018-12-20-002).

Dans ce contexte, ce projet vise à tester l'efficacité de relâché, la capacité d'adaptation à milieu naturel de juvéniles produits en éclosérie et leur taux de survie de relâché de juvéniles de denti et de corb, nés en éclosérie, afin de soutenir les populations naturelles dans un but de conservation de la biodiversité.

Ce projet utilisera la télémétrie acoustique (marquage individuel par un transmetteur électronique) afin d'obtenir, entre autre, des données de déplacements, de rythmes d'activité, d'activités de chasse, de territoire vital, et de fidélité au site pour des juvéniles de denti et corbs nés en captivité. 40 poissons nés en éclosérie (20 de chaque espèce) seront marqués à l'aide d'émetteurs acoustiques adaptés à leur taille (ainsi qu'avec un marquage spaghetti individuel externe) et suivis durant 6 mois au sein d'un cantonnement de pêche (Parc National Marin). Les données obtenues, en plus d'avoir un intérêt fondamental de compréhension du comportement d'espèces vulnérables, pourront être comparées avec des données internes de la plateforme, obtenues sur des individus sauvages afin de mettre en parallèle les comportements des individus nés en captivité et les comportements d'individus du milieu naturel. L'objectif sera ainsi d'étudier l'acclimatation de ces individus à leur nouvel environnement et leur utilisation de l'habitat, les rythmes d'activité, les comportements de chasse, etc. Ces résultats nous renseigneront sur la conservation des comportements innés et l'apprentissage, dans le milieu et sur du long terme, des individus issus de la plateforme.

Ce projet utilisera également des marquages de masse (i.e. permettant de reconnaître un lot et non pas une reconnaissance individuelle) et des suivis visuels en plongée ainsi que des prises de vidéos sous-marines afin d'évaluer la colonisation du milieu des juvéniles de ces deux espèces. En effet des mesures d'abondance en fonction du temps depuis le relâché, et de distance au site de relâché seront effectuées. Un total de 2000 juvéniles nés en captivité (1000 denti et 1000 corbs) seront marqués par injection colorée sous-cutanée (i.e. élastomère coloré ; différents codes couleurs) afin de pouvoir identifier des groupes d'individus.

Ainsi, au total sera utilisé 2040 individus produits en éclosérie afin de tester in situ l'efficacité de relâché, le taux de survie et de dispersion ainsi que la capacité d'adaptation aux conditions naturelles des juvéniles issus d'élevage.

A noter que nous avons suivi la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner)

- Remplacer : il est impossible dans le cadre de ce protocole de remplacer ces espèces par un autre modèle, l'intérêt du projet étant justement de comprendre le comportement de ces espèces.
- Réduire : le nombre d'individus marqués pour chaque espèce est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des effectifs suffisants pour obtenir une représentativité suffisante (i.e. variabilité du comportement) pour des tests statistiques adaptés (e.g. GLM, tests de comparaisons de moyenne de superficies de 'home range').
- Raffiner : tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie, d'asepsie et de chirurgie optimales (e.g. insertion de l'émetteur dans la cavité intra péritonéale, disposition d'un linge devant les yeux de chaque individu avant la chirurgie, maintien des ouïes dans l'eau avec apport continu d'eau pendant toute la durée de la chirurgie)

**19876** 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 injecter dans la moelle osseuse (injection au niveau du tibia, sous anesthésie générale et administration d'un anti-douleur avant et après l'injection) des cellules humaines normales capables de produire toutes les cellules sanguines ou des cellules humaines dérivées du cancer du sang 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. 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 soit 1260 souris immunodéficientes. Nous attacherons une grande importance au bien-être des animaux inclus dans ce projet. Les expériences d'injections seront réalisées sous anesthésie générale et

avec une analgésie pré- et post-opératoire. Afin de maintenir la température corporelle des souris anesthésiées, l'injection des cellules 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 souris se déplacent correctement et parviennent à se nourrir. 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.

**19877** La tuberculose demeure un problème majeur de santé publique et constitue un frein au développement économique. Au-delà de la souffrance humaine, cette infection prélève un lourd tribut sur les budgets individuels et gouvernementaux. Les microorganismes responsables de ces infections sont des bactéries du genre *Mycobacterium* et sont rassemblés sous le nom de complexe de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Les données épidémiologiques pour cette maladie sont édifiantes : 1/4 de la population mondiale est infecté et le taux de mortalité chez les adultes est plus élevé que celui causé par le SIDA, le paludisme et toutes les autres infections tropicales réunies. Des thérapies existent mais sont souvent tenues en échec par leur coût, leurs effets secondaires et l'apparition de souches résistantes. De même, un vaccin vivant, *Mycobacterium bovis* BCG, est disponible mais son efficacité est extrêmement variable en fonction des populations vaccinées. Il est donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques mais le support cognitif requis reste très limité. Dans ce contexte, notre objectif est d'apporter de nouvelles connaissances sur les facteurs produits par les bacilles de la tuberculose ou les adaptations métaboliques nécessaires pour se transmettre chez l'homme. Le présent projet s'inscrit dans ce cadre. Dans ce projet, nous cherchons à caractériser l'interaction hôte/pathogène dans différents modèles murins présentant des sensibilités différentes à l'infection (C57Bl/6 ou C3HeB/FeJ) avec des souches sauvages et mutantes de Mtb afin de comprendre l'impact des mutations. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés sont utilisés pour déterminer des paramètres de virulence des souches (charges bactériennes) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires) de réponse à l'infection.

Le nombre maximal d'animaux utilisés sera de 1500 souris se répartissant 750 souris C57Bl/6 et 750 souris C3HeB/FeJ. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 3 étapes dans notre raisonnement:

1) Remplacer : Différents modèles cellulaires ou animaux sont utilisés par les équipes travaillant sur la tuberculose. Malheureusement les modèles cellulaires ne permettent pas à l'heure actuelle de rendre compte de la totalité des étapes de l'infection d'un hôte par les mycobactéries pathogènes. Ainsi il n'existe aucun modèle cellulaire pertinent pour l'étude des phases tardives de la tuberculose telles que la persistance ou la transmission. Le modèle animal est donc incontournable à l'heure actuelle. Dans ce contexte, le modèle animal le plus couramment utilisé est le modèle souris. Ce modèle reproduit notamment au niveau immunologique bon nombre des observations faites chez l'homme.

2) Réduire : Les différentes phases des projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) seront suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des résultats. Nos expériences antérieures nous ont fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs. Toutes les expériences impliquant des animaux font l'objet d'un protocole expérimental écrit et validé par le responsable de l'animalerie. Nous utilisons des lots d'animaux homogènes pour réduire la variabilité. Enfin, nous essayons d'analyser plusieurs paramètres sur un même lot d'animaux (par exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes).

3) Raffiner : Dans toutes les expériences, les souches de souris ont été choisies en fonction de l'objectif de l'expérimentation (détaillé dans le descriptif de la procédure expérimentale). L'état sanitaire et le bien-être des animaux sont évalués tout le long de l'expérience par des personnels

formés et des points limites ont été définis. La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) lors de l'anesthésie et de l'infection des animaux, et ii) lors de l'inflammation pulmonaire chronique et des dommages tissulaires induits par l'infection mais où nous mettons en place des points limites précoces pour suivre les animaux et intervenir rapidement. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs.

**19878** 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. Des données récentes suggèrent que l'exposition des diètes déséquilibrés - hypercalorique ou déficiente en acides gras polyinsaturés (AGPI) - peut conduire à de tels troubles de la prise de décision en impactant cette transmission dopaminergique.

Le but de ce projet est de tester directement cette hypothèse. Pour cela, nous exposerons les animaux à des diètes hypercaloriques ou déficientes en certains AGPI, et manipulerons 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 évaluerons les conséquences sur la libération de dopamine par des techniques d'imagerie *in vivo*, et les processus de prise de décision grâce à des tests comportementaux. Nous prévoyons d'utiliser 810 souris mâles C57BL/6J, ce projet s'étendant sur une durée de 4 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 globale prolongée de l'activité, l'autre ciblant un mécanisme moléculaire précis.

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).

Remplacer: 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.

Réduire: Tous les efforts seront faits pour réduire le nombre d'animaux en effectuant plusieurs tests comportementaux chez les mêmes individus plutôt que des groupes différents, et de réduire les souffrances inutiles.

Raffiner: Un soin particulier sera porté au bien-être de l'animal tout au long de sa vie: 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.

**19879** La maladie de Parkinson (MP) est la deuxième maladie neurodégénérative après la maladie d'Alzheimer. Elle se manifeste principalement par des symptômes moteurs causée par la perte progressive des neurones dopaminergiques qui projettent vers le striatum, structure impliquée dans la réalisation des mouvements volontaires. L'étiologie de la MP est encore mal connue. Elle existe sous forme familiale liée à une hérédité génétique. L'une de ces formes est causée par une mutation du gène ATP13A2. Le développement d'un modèle animal pertinent de la MP (y compris les modèles impliquant la mutation ATP13A2) est un besoin non satisfait., ce qui rend difficile la compréhension des mécanismes sous-jacents de la pathologie et pour l'identification et la validation de stratégies thérapeutiques.

Sur la base d'observations récentes, nous avons conçu une double approche innovante pour modéliser la maladie (i) le choix de l'espèce (rat) car le rat est un modèle de choix dans la recherche



biomédicale et offre de nombreux avantages par rapport aux souris : les rats sont capables d'effectuer des tâches comportementales plus complexes. Actuellement, le rat présente le meilleur système de modèle mammalien « fonctionnellement » caractérisé et (ii) le choix de la cible : un gène lysosomal (ATP13A2 est une protéine lysosomale) lié à la MP ayant fait l'objet de très peu d'attention jusqu'ici pour la modélisation de la MP.

La caractérisation de ce nouveau modèle est essentielle pour vérifier s'il reproduit les changements cellulaires (dégénérescence neuronale, modifications mitochondriales et lysosomales ainsi que la présence d'inclusion de corps de Lewy) et les déficits comportementaux observés chez les patients atteints de MP. A ce jour, il n'y a pas de modèle qui reproduit chez l'animal l'ensemble de ces modifications. Un tel modèle serait un outil incontournable pour tester des stratégies thérapeutiques potentielles susceptibles de retarder la progression de la maladie ou même d'arrêter la dégénérescence des neurones dopaminergiques afin d'augmenter la qualité de vie et de prolonger la vie des patients atteints de la MP.

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 étape nous assurerons un suivi rigoureux des animaux afin de garantir que le modèle dispose des caractéristiques propres au développement de la MP et ne soit pas néfaste au bien-être animal. Dans le cas contraire, nous mettrons en œuvre l'ensemble des soins et limiterons la souffrance et le mal être à leur minimum en établissant des points limites stricts.

Ceci devrait couvrir une période de 5 ans et nécessiter l'emploi de 816 animaux et sera réalisé en application de la règle des 3R: Remplacer: Ces approches analysant le comportement de l'animal, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. Réduire: (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux en planifiant uniquement des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques. Nous utilisons des mâles et des femelles afin de réduire au minimum le nombre de couples reproducteurs. (ii) Nous mettrons en place des tests statistiques performants. Raffiner: nous avons planifié nos expériences en apportant une attention particulière pour limiter la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux en utilisant des tests comportementaux qui requièrent peu ou pas d'intervention directe de l'expérimentateur.

**19880** La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin incurable ce jour. Les traitements actuels visent à limiter l'inflammation. Des recherches sont donc nécessaires afin de mieux connaître la physiopathologie de la MC, de manière à pouvoir proposer de nouveaux traitements. Une des difficultés de cette maladie est son caractère multifactoriel faisant intervenir des facteurs génétiques, environnementaux et microbiens. La plupart des études *in vivo* se focalisent sur un de ces facteurs. Ici, nous nous proposons de les combiner de manière à mieux comprendre cette pathologie. Nous nous intéresserons à des facteurs très fortement suspectés de jouer un rôle clef dans la MC ; à savoir :

1- Le régime alimentaire : les études épidémiologiques ont clairement montré qu'un mode de vie « occidental » et notamment le régime alimentaire était impliqué dans l'apparition/le développement de la MC. Nous utiliserons un régime riche en gras et en sucre (HF/HS, pour « high fat/high sugar ») pour mimer ce facteur.

2- Les facteurs microbiens : de plus en plus d'études montrent que la composition de la flore intestinale des patients est perturbée. Parmi les modifications majeures, il est clairement établi que les malades présentent associés à leur muqueuse intestinale des bactéries appelées *Escherichia coli*. Les souris seront infectées par un *E. coli* de référence isolé d'un patient ou par un *E. coli* commensal, c'est-à-dire un *E. coli* non pathogène retrouvé normalement dans toutes les flores intestinales.

3- L'autophagie : de nombreux gènes sont retrouvés mutés chez les patients souffrant de MC. Parmi eux, de nombreux gènes impliqués dans l'autophagie. L'autophagie est un processus permettant la dégradation de protéines mal repliées, d'organelles non fonctionnelles. Plus récemment il a été montré que ce processus permettait de contrôler la prolifération des *E. coli* isolés de patients

souffrants de la MC. Nous utiliserons des animaux déficients pour l'autophagie ou des souris génétiquement non altérées (souris contrôles).

Sur la durée du protocole (5 ans), nous utiliserons un maximum de 360 souris. Aucune méthode alternative n'existe car nous désirons mieux comprendre la physiopathologie de la MC. 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. Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les données que nous possédons sur l'infection de souris avec des souches de E. coli isolées de patients MC indiquent qu'elles induisent une inflammation qui reste très modérée. Cependant, une attention particulière sera portée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur. Pour cela un suivi quotidien des animaux sera effectué de manière à détecter toute détresse animale. Si besoin, les animaux seront traités avec un anti-inflammatoire non stéroïdien, le paracétamol, qui sera administré par gavage. Le poids des souris sera également suivi avec attention car il reflète bien l'inflammation intestinale. Une perte de plus de 10% du poids initial (avant infection) constituera un critère d'arrêt. L'animal en question sera mis à mort. Enfin, l'apparition de signes de diarrhées sera également suivie avec attention. Chez les animaux avec diarrhée, la présence de sang dans les selles (utilisation de tests "hémocul") sera recherchée. Si du sang est retrouvé 2 jours consécutivement, l'animal sera mis à mort.

**19881** 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.

#### Amendement 1.

Pour les injections de vecteurs génétiques, nous utiliserons une anesthésie gazeuse qui permettra de mieux contrôler la profondeur et la durée de l'anesthésie ainsi que des analgésiques à durée d'action prolongée pour mieux contrôler la douleur et permettre une meilleure récupération des animaux. Nous utiliserons également de nouvelles lignées de souris qui nous permettront d'évaluer le rôle de senseurs métaboliques nouvellement identifiés et susceptibles d'être impliqués dans les anomalies du comportement alimentaire dans l'anorexie mentale. Les tests comportementaux et les explorations métaboliques sont réalisées avec un minimum de stress et de douleur. Le nombre de souris supplémentaire est de 160, soit au total 2000 souris.

**19882** La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC). Caractérisée par des troubles cognitifs, sensitifs et moteurs, elle fait partie des maladies les plus communes du SNC touchant plus de 2.5 millions de personnes dans le monde. Les traitements actuels n'ont aucun effet sur sa phase progressive. Il est nécessaire d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. L'une d'elles est de cibler le récepteur P2X7 (P2RX7), un récepteur purinergique qui est activé par l'adénosine-triphosphate extracellulaire (ATPe). Ce récepteur agit au niveau des systèmes immunitaire (induction de l'inflammation) et nerveux (régulation).

Les objectifs du projet sont : (i) de mieux comprendre le rôle de P2RX7 au cours de la physiopathologie de la SEP et (ii) d'évaluer son potentiel thérapeutique en utilisant des modèles de SEP. Pour cela, deux outils vont être utilisés la méthodologie appelée AAVnano et le modèle murin d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

La méthodologie AAVnano permet de produire par thérapie génique des nanobodies spécifiques de P2RX7. Les nanobodies (Nbs) sont de petits anticorps aussi spécifiques qu'un anticorps classique. Pour ce projet, des nanobodies anti-P2RX7 antagonistes (qui bloquent le récepteur) et agonistes (qui activent le récepteur) vont être utilisés. Ces Nbs seront produits après thérapie génique chez des souris femelles âgées de 7-8 semaines. Le modèle EAE sera ensuite induit afin d'étudier les effets potentiels des nanobodies générés sur la progression de la maladie. Deux souches de souris vont être utilisées : (i) des souris SJL/J pour induire une EAE mimant la SEP récurrente-rémittente et (ii) des souris C57BL/6 pour une EAE mimant la SEP progressive. Ce projet requiert l'utilisation d'au maximum 688 souris sur une durée de 5 ans.

L'équipe est composée d'immunologistes confirmés ayant travaillé plus de 15 ans sur les maladies autoimmunes et neurodégénératives utilisant des modèles murins. Ils ont par conséquent acquis une expertise poussée dans ce domaine, sachant la méthodologie, les techniques et les équipements requis afin de mener le projet.

Les études se feront chez la souris et nos résultats antérieurs nous permettent de mettre en place des procédures expérimentales en respectant le concept des 3R.

Remplacer :

Le modèle animal ne peut pas être ici remplacé car il n'existe pas de modèles *in vitro* capables de reproduire les signes cliniques et la complexité des mécanismes physiopathologiques inhérents

(impliquant les systèmes immunitaire et nerveux) au développement de la SEP. Le choix du modèle murin repose sur le fait que : (i) la souris présente une proximité génétique avec l'Homme et (ii) les modèles murins d'EAE ont été bien décrits et qu'ils sont capables de mimer à la fois l'aspect clinique et physiopathologique mis en jeu au cours de la SEP.

Réduire :

Une veille bibliographique sera régulièrement menée pour vérifier la pertinence du projet : résultats non publiés

Le nombre d'animaux utilisé tient compte de la variabilité des modèles d'EAE et sera établi de façon à obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Le nombre de 688 souris sur une durée de 5 ans a été déterminé selon l'expérience du laboratoire dans l'utilisation des modèles murins d'EAE et selon des analyses statistiques antérieures. Le nombre d'animaux par groupe et la répétition des expériences permettront de s'assurer de la validité statistique des résultats obtenus et de pallier les fluctuations expérimentales inhérentes à la variabilité des réponses, notamment immunologiques, entre les animaux d'un même groupe expérimental. Selon nos travaux et notre expérience, l'efficacité de l'induction de l'EAE est d'environ 85-90% et sachant les variabilités de la réponse clinique et des paramètres biochimiques, nous allons pouvoir contrôler, minimiser au possible et justifier la quantité d'animaux à utiliser pour l'ensemble du projet grâce à des études longitudinales et des analyses statistiques appropriées à savoir l'analyse de variance (ANOVA) à mesures répétées et Student-t-test.

En liaison avec le faible nombre d'individus par groupe ( $n < 30$ ), les analyses statistiques seront effectuées avec des tests non-paramétriques de Kruskal-Wallis et les post hoc test de Tukey.

Raffiner :

Nos animaux seront hébergés dans un portoir ventilé (5 par cage maximum) avec accès illimité à l'eau et à la nourriture. De l'enrichissement sera apporté grâce à des carrés de coton (cell-nest) et d'un dôme en cellulose pour la nidification. Le change de la litière sera hebdomadaire à jour fixe. La température de la zone d'hébergement est contrôlée (23-25°C) ainsi que les cycles jour/nuit de 12h. Avant chaque expérimentation, nous observerons une période d'acclimatation de 10 jours, et l'ensemble des procédures se fera sous une hotte en utilisant des réactifs et matériels stériles. Les animaux seront suivis quotidiennement pour identifier d'éventuels signes d'infections (si nécessaire, une pommade antiseptique sera utilisée), le poids sera mesuré quotidiennement : une perte importante de plus de 15% du poids initial (avant induction de la maladie) pendant plus de 48h sera un point limite entraînant la mise à mort, et les signes cliniques seront mesurés quotidiennement sous forme de scores EAE et différentes précautions pourront alors être entreprises : ajout de nourriture humidifiée, injection de solution saline selon le score. Enfin, l'ensemble des procédures sera réalisé sous anesthésie gazeuse ou sous mélange kétamine/xylazine.

**19883** 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 télines 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.

**19884** Notre laboratoire étudie le rôle des endozepines depuis plus de 30 ans. Il s'agit d'une famille de peptides cérébraux capables d'activer plusieurs récepteurs dont le récepteur GABAA, principal effecteur de l'inhibition dans le système nerveux central. Deux programmes de recherche sont en cours d'investigation : 1/ le rôle des endozepines dans la régulation de la prise alimentaire, afin de mieux comprendre leur implication dans l'anorexie mentale. 2/ L'effet des endozepine dans la régulation de l'inhibition, dans le but de mettre au point de future stratégie réparatrice après un AVC. Récemment, une nouvelle lignée de souris transgéniques a été mise au point : en substituant un acide aminé, les récepteur GABAA sont rendu insensible aux benzodiazépines et donc aux endozépines. Ces souris GABAAR $\gamma$ 2 KO, permettront donc de distinguer quelles fonctions des endozepines sont dues à la modulation de l'activité du récepteur GABAA (versus un autre

récepteur). Ces souris représentent donc des outils biologiques très utiles pour caractériser les fonctions cellulaires et physiologiques de ces peptides. La présente saisine vise à présenter les procédures permettant la maintenance et la reproduction des animaux de cette lignée au sein de notre établissement. Les projets scientifiques utilisant ces animaux feront l'objet de demandes spécifiques ultérieures.

Ces animaux, quoique récents et donc incomplètement caractérisés, ne présentent pas de signes évidents d'anomalie physique, physiologique ou comportementale. À l'examen visuel, il est impossible de les distinguer de leurs homologues non modifiés. Il s'agit en effet d'une mutation ponctuelle et non de l'ablation d'un gène entier. Par conséquent, la seule manière de distinguer les animaux possédant cette mutation est de recourir au génotypage en prélevant quelques cellules pour les analyser par PCR. Ces cellules seront prélevées au niveau de la queue à l'aide de micro-ciseaux chirurgicaux (biopsie), sous sédation à l'isoflurane (< 0,5mm à l'extrémité, l'opération durant 1 seconde).

Nous n'avons pas d'information précise sur la vitesse de reproduction de ces animaux. Trois femelles et 2 mâles constitueront l'origine de la lignée. Nous anticipons que plusieurs mois seront nécessaires avant d'atteindre un nombre de couples permettant de générer le nombre d'animaux adultes (>45 jours) nécessaire pour réaliser les investigations scientifiques. L'objectif est donc de parvenir à une capacité de production de 30 animaux par mois au maximum, lors des phases d'étude. En fonction des projets de recherche, cette production sera réduite jusqu'au rythme minimum d'1 portée par an pour assurer la pérennité de la colonie pendant 5 ans. Ainsi, cette saisine couvre le principe d'une production de 1800 animaux. La surveillance, les soins et les manipulations de ces animaux seront réalisés exclusivement par du personnel autorisé, formé et expérimenté, dans des locaux agréés.

**19885** L'importance de la rythmicité circadienne (c'est-à-dire des rythmes biologiques de 24 h) pour la santé et le bien-être humain ou animal est de mieux en mieux caractérisée. Les perturbations des fonctions circadiennes sont connues pour entraîner des troubles du métabolisme (obésité, diabète) et de la reproduction (réduction de la fertilité), et même certains cancers (par ex. cancer du sein chez les femmes en travail posté et cancer de la prostate chez les hommes en travail posté).

La désynchronisation circadienne (rythmes décalés dans la journée), induite par des altérations chroniques des facteurs synchroniseurs (décalage horaire chronique du cycle lumière/obscurité, pollution lumineuse de nuit), a un impact négatif sur plusieurs fonctions biologiques chez les rats et souris, rongeurs nocturnes classiques de laboratoire. Chez l'humain, ce sont surtout des investigations épidémiologiques, des questionnaires standardisés ou des études expérimentales à court terme qui fournissent des arguments sur les effets sanitaires du travail en horaires décalés et de l'exposition à la pollution lumineuse de nuit. Il existe un manque crucial de modélisation des effets du travail en horaires décalés et de la pollution lumineuse de nuit chez une espèce animale diurne. Cette modélisation est pourtant nécessaire à la compréhension des mécanismes biologiques impliqués dans l'effet néfaste de la désynchronisation circadienne chez l'humain dont l'activité est diurne. C'est dans ce but que notre laboratoire étudie la chronobiologie d'un rongeur diurne (*Arvicanthis ansorgei*). Dans ce contexte l'objectif de notre étude est de mettre au point les paramètres de suivi métabolique et reproducteur chez l'*Arvicanthis* femelle. Cette mise au point servira de base pour évaluer, dans un futur projet, les mécanismes biologiques impliqués qui conduisent la pollution lumineuse de nuit à des effets pathogènes sur le métabolisme et la fertilité.

Les méthodes d'investigation relativement peu invasives proposées dans cette saisine seront décisives pour connaître le cycle oestrien et la tolérance au glucose chez l'*Arvicanthis ansorgei* femelle.

Le cycle oestrien naturel de l'*Arvicanthis* est complexe. Le pic de l'hormone LH qui déclenche l'ovulation est difficile à déceler (taux, moment). Pour avoir un contrôle positif, assurant que la femelle *Arvicanthis* est capable de libérer de la LH, une injection intra-péritonéale de GnRH, stimulatrice de la libération de LH sera réalisée chez 4 individus.

Ce projet nécessitera 14 femelles (le cycle reproducteur féminin a des composantes journalières marquées) sur la durée du projet, soit 9 mois. Une attention particulière sera portée aux aspects éthiques de la recherche sur animal en respectant les règles des 3 R.

En terme de Remplacement, la régulation du métabolisme et des cycles reproducteurs impliquant plusieurs organes (notamment, cerveau, foie, pancréas, muscles, hypophyse, ovaires), l'investigation des interactions nécessite l'utilisation d'organismes entiers, et non pas d'organes ou de cellules isolées.

En terme de Réduction, le nombre d'animaux proposé (n= 14) est basé sur un nombre minimal qui prend en compte les moyennes et la dispersion des données comportementales recueillies dans des études antérieures. Ici nous privilégions le suivi longitudinal des mêmes animaux pour les 2 procédures, ce qui permet de diviser par deux le nombre d'individus utilisés.

En terme de Raffinement, les cages seront systématiquement enrichies d'un morceau de bois à ronger. L'ajout de matériel de nidification n'est pas utile chez les Arvicantis en stabulation car ni les mâles, ni les femelles hors reproduction ne construisent de nid avec ce matériau. 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.

**19886** Le choc septique est la complication la plus sévère des infections, grevé d'une mortalité supérieure à 40%. La physiopathologie du sepsis, complexe et incomplètement élucidée, se caractérise par une défaillance d'organes associant notamment des processus inflammatoires et hypoxiques et de reprogrammation métabolique. Des études ont démontré que le métabolisme mitochondrial, indispensable à la synthèse énergétique cellulaire, était perturbé au cours des états septiques graves et contribuait à la défaillance des organes. Nous avons observé *in vitro* que les macrophages soumis à une acidose métabolique sévère entrent dans un processus de pseudo-starvation associé à une autophagie et à une mitophagie. De façon surprenante, l'ajout d'acétoacétate (AcAc), corps cétonique, métabolite issu de la métabolisation des acides gras, permet de restaurer les capacités métaboliques cellulaires, de limiter le processus d'autophagie et de relancer la production énergétique mitochondriale. L'objectif de notre projet est de montrer que, l'AcAc ou que le régime cétogène conduisant à la production de corps cétoniques, peut être d'intérêt thérapeutique pour augmenter la tolérance des tissus au stress acide et améliorer le pronostic des patients en état de choc septique. En effet les cellules de patients en acidose métabolique présentent des dysfonctions mitochondriales qui peuvent être corrigées *in vitro* par ajout d'AcAc. Nous souhaiterions donc dans un modèle murin de choc septique, tester l'hypothèse que l'AcAc empêche les dysfonctions mitochondriales et permet de protéger les cellules du stress induit par l'acidose. Des études récentes ont confirmé que l'amélioration de la tolérance des tissus aux dommages engendrés par le sepsis pourrait être une option thérapeutique complémentaire prometteuse dans cette pathologie mortelle.

Notre projet a pour objectif de déterminer l'implication de l'AcAC et du régime cétogène dans la physiopathologie du sepsis et leurs rôles protecteurs potentiels. Le but de cette expérimentation animale chez la souris est d'apporter des preuves de l'importance de l'AcAC et des corps cétoniques dans la survie au sepsis. L'étude se fera sur des souris C57BL/6J en choc septique obtenu par la technique de ligature et ponction caecale. Une fois l'animal en état de choc septique avec acidose lactique, trois lots de 42 souris seront faits : un avec injection d'AcAc, un second avec les souris sous régime cétogène et un groupe contrôle avec administration de PBS. Si ces résultats permettent d'augmenter la survie des souris sous régime cétogène ou sous AcAc, nous referons l'expérience avec un traitement par un antibiotique associé (gentamycine) de façon à voir le rôle de ces traitements en soin complémentaire, 3 lots de 30 souris seront nécessaires. Le nombre total de souris nécessaire sera donc de 216.

Suite à l'induction du sepsis, les souris seront suivies toutes les 4 heures puis quatre fois par jour. Pour éviter la souffrance de l'animal au cours du protocole expérimental, des indicateurs comportementaux et physiques prédéfinis (état général, comportement/mouvement, évolution pondérale) seront évalués quotidiennement et constitueront, suivant un score, les points limites de l'expérience. Notre démarche expérimentale tient ainsi en compte la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux par l'utilisation du nombre minimum permettant des statistiques fiables, raffinement du protocole expérimental, les animaux seront anesthésiés et analgésiés pour éviter leur souffrance, pour éviter le stress des animaux de la musique est mise dans la pièce de stabulation, des petites maisonnettes ainsi que des petits objets en nylon à grignoter sont présents dans les cages pour enrichir le milieu, et remplacement des animaux par des expériences *in vitro* préalablement réalisées ayant montré l'implication de ce métabolite dans la protection cellulaire. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises des bonnes pratiques de laboratoire.

**19887** La jonction neuromusculaire (JNM) est la zone de contact entre les neurones moteurs et les muscles striés squelettiques qu'ils innervent. Cette synapse est responsable de l'initiation et du contrôle du mouvement. Le dysfonctionnement de cette synapse entraîne un défaut de la transmission nerf/muscle avec des conséquences dramatiques sur notre capacité à contracter nos muscles, nous mouvoir ou tout simplement respirer. Décrypter comment la JNM acquiert sa morphologie complexe, régule et module sa communication nerf/muscle au cours du développement embryonnaire et tout au long de la vie au cours de la vie est essentielle pour comprendre comment le système nerveux fournit le lien entre les pensées et les actions en relayant des messages qui voyagent si vite que nous ne les remarquons même pas. Compte tenu de la signification fonctionnelle de ces connexions spécifiques, même des défauts subtils dans les événements moléculaires entraînant l'attachement nerf / muscle sont à la base d'un large éventail de troubles neurodéveloppementaux. Par conséquent, l'étude des mécanismes moléculaires qui sous-tendent la formation et la maintenance de la JNM est très importante pour permettre de comprendre les mécanismes mis en jeu et restaurer une connectivité synaptique appropriée dans les pathologies de la JNM. Cette étude fournira les bases essentielles au développement de nouvelles approches thérapeutiques essentielles pour contrer les pathologies de la JNM humaine.

La formation de la JNM est organisée par différents signaux provenant du nerf et/ou du muscle qui vont instruire et guider le cône de croissance neuronal vers son site d'attachement final sur le muscle. Ceux-ci sont encore mal connus, mais certaines molécules critiques dans ce processus ont été mis en évidence. L'objectif de ce projet est par conséquent d'étudier *in vivo* les mécanismes moléculaires pathophysiologiques qui sous-tendent la formation et la maintenance de la jonction neuromusculaire (JNM) des mammifères. Le projet a pour but de comprendre les mécanismes d'action de ces molécules dans un contexte physiologique et pathologique *in vivo* à l'aide l'analyse de différentes souris transgéniques porteuses de mutations ou délétion de tout ou partie de molécules impliquées dans la formation de la JNM et par l'utilisation d'approches de gain ou de perte de fonction des molécules ciblées par ce projet. In fine ce travail fournira la base pour le développement d'essais cliniques sur une cohorte de patients atteints de certains types de pathologies neuromusculaires. Cette analyse *in vivo* ne peut être remplacée par des études conduites *in vitro* du fait de l'absence de modèle cellulaire *in vitro* reproduisant la jonction nerf/muscle. Elle représente donc une étape importante avant la mise en place d'essais cliniques sur l'homme. Pour répondre à cet objectif, des études phénotypiques de la JNM à 2 stades du développement embryonnaire (E14.5 et E18.5) et à 4 stades adultes (P20/P40/P90/P180) ainsi que des tests comportementaux de mesure de l'activité motrice sont envisagés. Une étude alternative et complémentaire de perte de fonction des molécules candidates par injection virale est également envisagée. Les souris utilisées pour ce projet correspondent à 3 lignées transgéniques porteuses de délétion de gènes codant pour MuSK, ColQ et STMN2 ainsi que d'une approche par injection virale des molécules ciblées. Le protocole porte sur un total de 204 animaux. Ce nombre se justifie pour que les résultats soient statistiquement significatifs à la fois au cours du développement embryonnaire et aux stades adultes. Le protocole et la démarche scientifique utilisée s'effectue



dans le respect de la règle des 3R: Remplacer: en l'absence de modèles alternatifs type culture cellulaire compatibles avec l'étude de la maintenance de la jonction neuromusculaire et représentatifs de la pathologie. Réduire: en utilisant un nombre minimum d'animaux qui permettent l'obtention de résultats statistiquement fiables, Raffiner: en veillant au bien-être des animaux, de leurs conditions d'hébergement et en limitant leur douleur par l'administration d'analgésique si nécessaire. Un suivi journalier des animaux est réalisé par le personnel de l'animalerie. En cas d'apparition de signes extérieurs de souffrance, les animaux seront euthanasiés.

**19888** La transfusion sanguine reste un des piliers du traitement dans de nombreux états pathologiques puisqu'on estime que 85 millions d'unités de globules rouges (GR) sont transfusées dans le monde chaque année.

Le terme « lésion de stockage » est utilisé pour définir l'ensemble des altérations que subissent les GR pendant le stockage hypothermique des poches. La transfusion de sang stocké 42 jours n'est pas associée à un risque accru de mortalité chez l'homme cependant l'impact du stockage sur l'efficacité transfusionnelle est moins connu et passe par l'étude des altérations des GR lors de leur stockage en banque, mais aussi par la compréhension de la modulation du devenir du GR transfusé par l'état du receveur.

La constitution de banques de sang, la transfusion et la mesure de rendement transfusionnel nécessitent l'utilisation de modèles animaux mammifères. En effet, ces mécanismes impliquent plusieurs systèmes et une régulation hormonale fine qui ne peuvent pas être mimés *in vitro*. La caractérisation simultanée des propriétés des GR *in vitro*, côté donneur, avec les données de rendement *in vivo* dans les différents modèles de souris receveuses permettront à la fois d'identifier les propriétés du GR menant à son élimination et les mécanismes de régulation physiologique de la clairance érythrocytaire par l'anémie. L'étude de mécanismes fondamentaux ne peut être envisagée sur l'homme en l'état mais les résultats pourraient avoir une importance considérable en particulier dans le traitement de certaines anémies génétiques. Le modèle animal est un intermédiaire incontournable.

L'étude des caractéristiques morphologiques, biomécaniques et biochimiques des GR est possible *ex vivo* mais la mesure de la clairance des GR est encore tributaire de l'utilisation de modèles animaux puisque dépendante de plusieurs tissus et types cellulaires et du contexte physiologique global d'un individu. Des GR de souris stockés en banque seront transfusés à des souris receveuses afin de vérifier nos hypothèses sur l'état du receveur comme facteur déterminant du rendement transfusionnel. L'hypothèse d'une régulation de la clairance des GR par l'anémie sera évaluée en étudiant différents modèles de souris receveuses qui permettront d'évaluer la contribution de l'ensemble des facteurs impliqués dans la réponse physiologique à l'anémie. Pour identifier la mécanistique de la régulation de la clairance des GR par l'anémie, nous utiliserons des modèles murins transgéniques avec invalidation spécifique, dans des cellules ciblées, du gène du récepteur à l'érythropoïétine (EPO) ou des facteurs de transcription induits par l'hypoxie. Au delà du contexte transfusionnel, nous étudierons la cinétique de clairance des GR endogènes et les mécanismes régulant la biomasse de GR circulants.

Le nombre d'animaux utilisés s'élève à 908 pour une durée de 5 ans.

Dans le respect de la règle des 3R, le projet a été conçu dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Une partie *ex vivo* permet de remplacer partiellement le modèle animal. Les animaux bénéficieront de conditions d'hébergement améliorées d'enrichissement du milieu consistant en des cotons, des tunnels et des bâtonnets à ronger. Des points limites sont utilisés dans plusieurs expériences afin de permettre une détection précoce d'un état de souffrance et d'en minimiser les conséquences. Ce projet permettra à terme de mieux comprendre l'étiologie de l'anémie dans certaines pathologies où les taux d'EPO sont anormaux.

Amendement

L'amendement proposé nécessite l'ajout de 179 animaux:

- Un lot de souris splénectomisées a été ajouté à la procédure 11 (21 animaux).

- Une nouvelle procédure d'irradiation sub-léthale (procédure 12) a été ajoutée (108 animaux).
- 50 animaux ont été ajoutés à la procédure 1 afin de transférer les animaux de la nouvelle procédure 12.

**19889** Des publications récentes documentent l'importance de l'activité des astrocytes, en général, dans la régulation du sommeil. Cependant, les mécanismes et les réseaux neuronaux affectés par la modulation de l'activité astrocytaires ne sont pas connus. Nous avons donc choisi d'étudier ces interactions neuro-astrocytaires dans l'aire pré-optique (A.P.O.) de l'hypothalamus qui est connue pour son rôle crucial dans l'induction du sommeil.

Nous utiliserons, dans un premier temps, une approche génétique pour éliminer très sélectivement les astrocytes de cette région. La région pré-optique de l'hypothalamus, située à la base antérieure du cerveau, contrôle également d'autres fonctions essentielles telles que les régulations homéostatiques (régulation de la température corporelle, de la soif) mais aussi la régulation des comportements sociaux (agressivité, anxiété, comportement reproducteur et maternel). Les conséquences physiologiques de l'ablation des astrocytes dans cette région sur les comportements sociaux d'une part et sur les grandes fonctions homéostatiques d'autre part seront évaluées dans un premier temps chez les souris adultes.

Bien que les neurones contrôlant ces fonctions soient déjà présents à la naissance, ces fonctions sont encore très immatures chez le nouveau-né, humain ou animal. Chez le souriceau nouveau-né, le sommeil est fragmenté et entrecoupé de rares périodes de veille. Les phases de sommeil profond et paradoxal commencent à se mettre en place 10 jours après la naissance. De la même façon, la température corporelle des souriceaux à la naissance (jusqu'à P7) suit la température ambiante. Les mécanismes de thermorégulation commencent à se mettre en place entre 7 et 15 jours après la naissance et deviennent complètement fonctionnels au moment du sevrage. Les astrocytes, contrairement aux neurones, continuent à se multiplier en période post-natale et ne se constituent en réseaux fonctionnels qu'après plusieurs semaines. L'objet de notre étude est donc d'évaluer l'importance des astrocytes dans la maturation de ces grandes fonctions. Nous caractériserons précisément, d'un point de vue anatomique, la mise en place post-natale du réseau astrocytaire dans la région pré-optique de l'hypothalamus. Si l'ablation des astrocytes de cette région entraîne des perturbations du sommeil et de la thermorégulation chez l'adulte, nous étudierons plus précisément le rôle de l'apparition des astrocytes dans ces régulations au cours du développement post-natal.

Enfin, pour explorer les mécanismes de la maturation des astrocytes de l'A.P. O nous invalideront un gène crucial pour cette maturation astrocytaire, sélectivement de la région pré-optique, et nous en étudierons les conséquences fonctionnelles

Cette étude se déroulera sur 5 ans et nécessitera 336 souris.

Il n'est pas possible d'étudier la régulation de ces grandes fonctions autrement que chez l'animal vivant. Cependant, la succession des évaluations physiologiques de ces animaux sera optimisée pour réduire au minimum le nombre de souris nécessaire à cette étude et les approches non invasives seront privilégiées. Les conditions d'élevage (enrichissement du milieu, suivi des animaux) en vigueur dans l'animalerie de notre établissement seront appliquées dans le cadre de ce projet.

**19890** En élevage avicole biologique et label, l'accès à un parcours extérieur pour les animaux est une obligation réglementaire. Le parcours contribue en partie au bien-être animal car il apporte un environnement adapté à l'expression naturelle de leur comportement exploratoire.

Cependant, le parcours de volaille constitue également un réservoir de macro-parasites qui peuvent représenter un facteur de risque pour la santé animale. Parmi eux, les helminthes (vers parasites intestinaux) peuvent avoir un impact technico-économique considérable dans les élevages de volailles : diminution (ou augmentation sans prise de poids) de la consommation alimentaire,

surconsommation d'eau, amaigrissement, baisse de performances, déséquilibre digestif, diarrhées, mortalité...

Lors des sorties sur le parcours, les poulets consomment l'herbe et les plantes à disposition dont l'intérêt peut être nutritionnel, sanitaire et/ou bien-être (« enrichissement »). Dans le cadre d'un précédent projet, quelques plantes reconnues pour leurs propriétés médicinales ont été testées. Celui-ci avait étudié la faisabilité d'introduire sur le parcours des espèces végétales à vertus thérapeutiques pour lutter contre le parasitisme des volailles. Cependant, leur efficacité n'avait pas été testée.

L'objectif de ce nouveau projet est l'évaluation de l'effet antiparasitaire des 5 plantes, la Tanaisie, le Fenugrec, le Chénopode vermifuge, la Nigelle et le Souci officinale, chez les poulets de chair.

Le projet portera sur 222 poulets de chair répartis en 7 modalités (5 modalités avec plantes + 2 modalités témoin).

Règle des 3R :

Le remplacement n'est pas possible car il n'existe, à ce jour, aucune technique *in vitro* pour étudier les réponses physiologiques des individus face aux stimuli auxquels ils sont exposés.

La réduction est prise en compte : la taille des effectifs (n=222 avec 31 animaux par modalité + 5 animaux supplémentaires pour vérifier le statut sanitaire de l'élevage) est optimisée pour garantir un nombre suffisant de répétitions pour évaluer l'effet des plantes sur la santé des poulets. Une analyse de variance sera faite sur les résultats individuels avec comparaison de moyenne. Notre effectif de départ est de 31 animaux par modalité pour en avoir 20 en fin d'expérimentation. En effet, 10 animaux seront retirés pour les besoins de l'expérimentation et nous avons estimé une mortalité à 2%. L'effectif final de 20 animaux par modalité nous permettra d'avoir (selon un test de puissance), une puissance de 80% et un risque d'erreur de 10% sur la base des performances de croissance.

Le raffinement : Les animaux seront élevés au sol sur des copeaux, en groupe afin de créer des relations sociales. Ils seront hébergés dans des parquets de 3m<sup>2</sup> selon les normes réglementaires définies par l'arrêté du 28 juin 2010 établissant les normes minimales relatives à la protection des poulets destinés à la production de viande et dans des conditions optimales d'alimentation et de soins. Les animaux seront hébergés dans des conditions optimales d'alimentation et de soins. Des points limites sont déterminés et une évaluation d'évaluation du bien-être des poulets sera complétée quotidiennement par le personnel animalier pour permettre de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement.

**19891** La mesure de la pression intra-abdominale (PIA) représente un enjeu clinique majeur dans les services de réanimation et les unités de soins intensifs. L'augmentation soutenue et répétée de cette PIA peut conduire au syndrome de compartiment abdominal (développé par 8% des patients de ces services), responsable d'une majoration de la mortalité et de la morbidité. De plus, des recherches actuelles démontrent un intérêt potentiel de la mesure de la PIA dans le domaine de la chirurgie abdominale. En effet, le conflit entre la PIA et la résistance de la paroi abdominale est à l'origine de la survenue des hernies abdominales, l'une des causes les plus fréquentes d'intervention chirurgicale dans le monde (45 000 réparations herniaires en France par an et plus de 500 000 aux Etats-Unis).

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode ou d'outil permettant une mesure continue, fiable et surtout peu invasive de la PIA. En effet, la méthode standard est la mesure intermittente de la pression intravésicale reposant sur l'insertion d'une sonde par l'urètre après avoir rempli la vessie à l'aide d'une solution saline. Cette méthode présente des risques infectieux et est chronophage.

Le développement d'un outil de mesure de la PIA qui serait peu invasif, à risque limité, sans inconfort et simple d'utilisation (en termes de temps et de coût) semble être d'un intérêt clinique majeur.

La Smartpill est un dispositif médical commercialisé par Medtronic [(SmartPill™, Medtronic, Minneapolis, MN)] pour l'évaluation des troubles du transit intestinal chez l'Homme. Cette capsule qui peut être ingérée contient des capteurs de pH, température et de pression. Notre hypothèse est

que ce dispositif pourrait permettre une mesure fiable et continue de la pression intragastrique, sans présenter de risque infectieux ou d'inconfort majeur. Comme toutes les méthodes existantes de mesure indirecte de la PIA, celle-ci reposerait sur l'hypothèse de l'égalité de la pression au sein de l'abdomen. En effet, d'après les lois de la mécanique des fluides, la pression serait la même en tous points de la cavité abdominale et des organes abdominaux creux (tant que ces points se situent à la même hauteur).

De plus, une ceinture abdominale permettant la mesure externe et continue de la pression intra-abdominale est actuellement en cours de développement.

Le but de ce travail est donc triple :

- Valider la Smartpill en tant qu'outil de mesure de la pression intragastrique
- Tester de façon préliminaire la nouvelle ceinture abdominale en tant qu'outil de mesure de la pression intra-abdominale
- Vérifier l'hypothèse de l'égalité de la pression au sein de la cavité abdominale et des organes creux. Une étude utilisant la Smartpill afin d'évaluer les niveaux de pression intra-abdominale chez l'Homme a déjà été réalisée par notre équipe et un article a été soumis.

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

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

Utilisée à d'autres fins de diagnostic, la Smartpill bénéficie déjà d'une autorisation d'utilisation chez l'Homme et est approuvée en tant que dispositif médical par la FDA et l'ANSM. De plus, les différentes méthodes de mesures de la PIA utilisées dans ce protocole sont toutes déjà utilisées en clinique chez le patient. Cependant, la comparaison entre les mesures de pression de la Smartpill et celles d'un capteur intragastrique direct ainsi que la vérification de l'hypothèse des pressions ne peuvent être envisagées chez l'Homme de par le caractère invasif du protocole utilisé. Seul le modèle animal permet une telle validation d'une nouvelle méthode de mesure. (Exigence ANSM et FDA)

Il s'agit de procédures standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (peropératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 3 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion...).

Les animaux seront opérés sans groupe témoin pour minimiser leur nombre

Le nombre maximum d'animaux sera de six

Les mesures seront réalisées chez des animaux à l'issue d'une autre procédure de recherche afin de respecter au maximum la règle des 3R et de réduire le nombre d'animaux utilisés.

**19892** L'ocytocine et la vasopressine sont deux hormones secrétées par le cerveau pour réguler les comportements sociaux et affectifs. De nombreuses études cliniques sont actuellement menées chez l'homme avec ces hormones dans l'espoir de corriger des maladies psychiatriques du comportement social. Nous avons ciblé une maladie génétique dont les porteurs ont un risque élevé d'autisme pour laquelle un traitement aigu à la naissance avec l'ocytocine améliore les symptômes à court terme, et dans un modèle animal qui bénéficie d'effets persistents chez l'adulte.

Nos données préliminaires indiquent que ces hormones modifient l'activité du cerveau des adultes. Le projet vise deux objectifs principaux: (1) déterminer les actions des hormones sociales sur le fonctionnement du cerveau et sur le comportement social de l'adulte et (2) déterminer si le traitement depuis la naissance avec de l'ocytocine permet de corriger le fonctionnement du cerveau chez l'adulte.

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 neurodéveloppement et comportement. Cette recherche n'a pas identifié de solution *in vitro* alternative conservant les systèmes de neurones en réseaux récapitulant les programmes de développement de la naissance à l'adulte qui sont nécessaires pour ce projet. Nous étudierons des modèles génétiques murins caractérisés pour leurs similitudes avec des pathologies humaines et parce que ce sont des animaux sociaux.

Réduire:

Tous les modèles seront croisés dans la même souche génétique selon les études précédentes de notre laboratoire.

Des tests statistiques nous permettront de réduire le nombre d'animaux. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit grâce à une approche longitudinale rationnelle de plusieurs paramètres sur les mêmes animaux.

L'objet de la présente demande, qui concerne 312 animaux, consiste en une série d'expérimentations au cours desquelles l'activité du cerveau sera enregistrée voire modifiée pendant le comportement social.

La réalisation du projet concerne 26 groupes expérimentaux et contrôles divisés en 5 conditions expérimentales sur des animaux sauvages ou génétiquement modifiés déjà validés comme modèle d'étude de la maladie.

Deux tests seront pratiqués pour mesurer une exploration sociale dans un contexte tantôt positif tantôt négatif. L'objectif de cette pratique sera d'établir la spécificité d'action du cerveau dans des contextes différents.

Raffiner:

Le raffinement implique un hébergement dans un environnement enrichi (copeaux de litière, igloo et coton dans la cage pour faire un nid) avec libre accès à l'eau et à la nourriture.

Les animaux seront stabulés en cage transparente et suivis quotidiennement pour des signes de détresse/infection/souffrance en utilisant une grille de score comportant des points limites. Le cas échéant, des agents antidouleurs et anti-inflammatoires seront administrés afin de réduire la douleur et la souffrance des animaux.

**19893** Les anticorps monoclonaux puis l'ingénierie moléculaire ont rénové la sérothérapie, multipliant les possibilités d'intervention thérapeutiques et apportant de nouveaux succès cliniques. Le premier article décrivant la génération d'un anticorps monoclonal ayant une spécificité prédéfinie a été publié dans la revue Nature en 1975 par César Milstein (1927-2002) et Georges Köhler (1946-1995) et a valu à ses deux auteurs de partager le prix Nobel de physiologie ou médecine en 1984. L'exploitation de la technique d'hybridation cellulaire en immunologie dans le but d'étudier la structure des anticorps a permis à Köhler et Milstein d'immortaliser et de sélectionner une cellule hybride sécrétrice d'anticorps anti-globules rouges de mouton. Il s'agit de la technique des hybridomes. Le principe consiste à faire fusionner une cellule de rate sécrétrice d'anticorps provenant d'une souris BALB/c immunisée et une cellule murine de myélome. Les lignées myéломateuses sont sélectionnées pour leur déficit en une enzyme impliquée dans la voie de synthèse des acides aminés. Cette déficience est exploitée dans la sélection des hybridomes. C'est la stratégie la plus courante pour générer des anticorps spécifiques d'un antigène. Les anticorps monoclonaux et leurs dérivés constituent la classe des principes actifs qui connaît le plus fort taux de développement actuel dans les domaines biotechnologique et pharmaceutique. En effet, ces anticorps sont des outils de recherche, des réactifs pour les tests d'analyses biologiques et des candidats potentiels à une utilisation thérapeutique. L'objectif scientifique de ce projet consiste à générer des anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes suite à l'immunisation de souris avec l'antigène d'intérêt. Un lot de 10 souris BALB/c est utilisé par programme de génération d'anticorps monoclonaux. Il est estimé qu'environ 12 programmes par an seront mis en œuvre par an soit l'utilisation au maximum de 120 animaux, soit 600 souris pour l'ensemble du programme.

Nombre de nos projets sont menés sur des cibles complexes pour lesquelles peu ou aucun anticorps n'a pu être encore développés. Notre démarche prend en compte d'optimiser le nombre d'animaux par programme pour réduire le nombre de programme à effectuer pour obtenir des anticorps d'intérêts. Nous privilégions le confort de l'animal (anesthésie légère des animaux lors des injections IV. Enfin, toute démarche expérimentale n'est mise en œuvre que si aucun autre modèle *in vitro* ou *in silico* n'est disponible, ce qui est souvent le cas pour les anticorps monoclonaux. Concernant le raffinement des conditions d'hébergement, tous les animaux possèdent du matériel de nidification et de protection dans leur cage. Les souris sont au minimum trois par cage, ceci afin qu'elles ne soient pas isolées car elles préfèrent vivre en groupe. La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées au sein de l'animalerie pour répondre aux besoins des espèces hébergées. Le succès pharmaceutique et industriel des anticorps monoclonaux s'explique par la maturité technologique qui permet de produire ces anticorps sous forme recombinante dans des cellules de mammifères. La génération d'anticorps monoclonaux par la technique des hybridomes a permis de développer de nouveaux outils pour la recherche biomédicale. Leur utilité est déjà prouvée dans les nouvelles technologies de la génomique, de la protéomique, de l'imagerie et de la nanobiotechnologie. Malgré quelques difficultés, le potentiel des applications thérapeutiques et diagnostiques ouvre des perspectives ayant un grand impact socio-économique. Il est certain que l'acquisition de ces technologies de laboratoire est primordiale notamment pour l'industrie pharmaceutique de demain.

**19894** Contrairement à d'autres espèces, les veaux, les agneaux et les chevreaux sont totalement dépourvus d'anticorps à la naissance en raison de l'absence de transfert d'anticorps transplacentaire. Les immunoglobulines G (IgG) présentes dans le colostrum chez la vache laitière (20 à 80 g/L) permettent de transmettre l'expérience immunologique de la mère au nouveau-né (immunité passive) en attendant que celui-ci développe sa propre immunité (immunité active). L'absorption intestinale des IgG n'est possible que pendant les premières heures de vie, il est donc recommandé d'apporter au nouveau-né du colostrum riche en immunoglobulines dans les six heures suivant la naissance.

Dans le cas où, la qualité ou la quantité de colostrum ne sont pas suffisantes, des suppléments colostraux en poudre sont disponibles. Ceux-ci sont produits à partir de colostrum déshydraté qui apporte une solution aux éleveurs lors des premières heures déterminantes pour la santé des jeunes animaux.

Les immunoglobulines sont présentes en quantité massive dans le colostrum (20 à 80 g/L), cependant le lait contient également des immunoglobulines qui sont concentrées dans la fraction lactosérum (0,7 g/L) lors de la fabrication du fromage. Un procédé spécifique de concentration par ultrafiltration a été développé à l'échelle pilote. Celui-ci permet d'atteindre une concentration en immunoglobulines supérieure à 20 g/L.

L'objectif de l'étude est de déterminer, chez le veau nouveau-né, si les immunoglobulines extraites du lactosérum et apportées par voie orale sont transférées vers la circulation sanguine dans les mêmes proportions que les immunoglobulines présentes dans le colostrum. Pour cela, des quantités équivalentes d'immunoglobulines issues, soit de colostrum déshydraté, soit d'un concentré issu du lactosérum, soit d'un mélange des 2 sources sont distribuées aux veaux dans les deux heures après la naissance afin de mesurer dans chaque cas, le transfert d'immunité passive (TIP). Pour évaluer la concentration sanguine en immunoglobulines, quatre prélèvements sanguins seront réalisés par veau (0 h., 24 h., 72 h. et 14 jours après la naissance). Ils seront élevés dans les conditions habituelles d'un élevage laitier et seront vendus à l'âge de 6 mois pour intégrer la filière de production de viande.

Cet essai permettra de valider ou non l'intérêt de développer le procédé de concentration d'immunoglobulines à l'échelle industrielle. Cette nouvelle source d'immunoglobulines permettrait de rendre plus accessible les compléments colostraux et de participer ainsi à la gestion préventive des risques sanitaires.

1) Remplacer : Pour atteindre les objectifs de cette étude, le recours à des animaux est indispensable. Il n'existe pas de modèle *in vitro* robuste pour l'étude du transfert d'immunité passive chez le veau.

2) Réduire : Neuf veaux seront mis en essai (3 veaux par modalité).

3) Raffiner : L'intervention la plus douloureuse correspond à la piqure d'une aiguille pour la prise de sang. Cet acte est réalisé par des personnes formées et habituées à ce type de prélèvements. La durée de la contention et de la prise de sang est réduite au minimum pour limiter le stress des animaux. Cet acte est répété à un intervalle de temps de 24, 72 heures et 14 jours correspondant à des moments critiques qui permettront d'évaluer la qualité du transfert des immunoglobulines dans chaque condition, laissant le temps à l'animal de récupérer entre 2 prélèvements. L'observation des veaux après les prélèvements est nécessaire afin de détecter d'éventuelles anomalies (prise alimentaire, mobilité et vivacité du veau). En cas de problème, le vétérinaire sera contacté.

**19895** Depuis les années 90, la présence de débris plastiques (macroplastiques) dans les rivières, les rivages et les océans ne cesse d'augmenter. Ces débris plastiques, que nous visualisons au quotidien dans notre environnement, vont subir des contraintes très fortes dans l'environnement induisant des transformations (dégradation par le rayonnement UV, la température, des microorganismes) et ainsi se fragmenter. Cette fragmentation conduit à la formation de débris de taille micrométrique, appelés « microplastiques » (MP) et dont la taille est comprise entre 1 et 5 mm, mais également en « nanoplastiques » (NP) dont la taille est comprise entre 1 et 1000 nm. Ces dernières années, des MP et NP ont été observés dans les écosystèmes aquatiques, soulevant des craintes vis-à-vis de leur impact. La majorité des études porte actuellement sur les effets de ces débris en milieu marin, alors que les milieux estuariens et d'eau douce sont peu étudiés malgré leur rôle important dans le transfert des plastiques vers l'océan.

L'objectif du projet est de répondre à ce manque en étudiant les impacts des MP et NP sur différents organismes d'une chaîne alimentaire vivant dans le continuum eau douce-eau marine : des algues, des bivalves et l'anguille européenne (*Anguilla anguilla*). L'anguille est un organisme d'intérêt car (1) il s'agit d'une espèce menacée (en danger critique d'extinction en France et en Europe, sur liste rouge UICN, annexe 2 de la Convention de Washington et règlement européen CE No 1100/2007) et (2) en tant qu'espèce comestible, l'être humain pourrait être exposé aux plastiques par son ingestion. Alors que des particules plastiques peu représentatives de celles identifiées dans le milieu naturel sont testées dans la plupart des études en laboratoire, nous utiliserons des particules allant du micro au nanomètre à partir de débris échantillonnés sur le terrain, à des concentrations similaires à celles susceptibles d'être observées dans l'environnement (de 0,008 à 100 µg/L).

Pour évaluer les effets des MP et NP et leur transfert au sein d'une chaîne alimentaire, les animaux seront acclimatés aux conditions de laboratoire et exposés pendant 21 jours à des proies enrichies en MP ou NP. Ces derniers seront composés de polyéthylène, polypropylène et polystyrène provenant d'échantillonnages réalisées sur le terrain ou de plastiques de référence. Le nombre total d'anguilles étudiées lors de ce projet sera de 80, correspondant à huit anguilles par condition, et ce pour dix conditions (neuf conditions plastiques et une condition témoin). Les proies utilisées pour les anguilles correspondront aux bivalves qui auront préalablement consommé des algues contaminées aux particules plastiques. Des estimations de l'accumulation et du transfert des particules d'un niveau de la chaîne alimentaire à un autre seront menées chez les organismes à partir des mesures de quantification des MP et NP dans leurs tissus, ou à défaut à partir des métaux préalablement identifiés sur les plastiques et pouvant servir de marqueurs de contamination en plastiques. Les effets de ces particules sur les anguilles seront ensuite déterminés en utilisant une approche incluant plusieurs marqueurs allant des mesures au niveau individuel (rapport poids/taille, rapports poids du foie/poids du corps et comportement alimentaire) à celles au niveau sub-individuel (analyse de biomarqueurs impliqués dans les réponses immunitaires et dommages de l'ADN). Au niveau moléculaire, des analyses transcriptomiques seront développées de manière à étudier l'ensemble des voies métaboliques potentiellement impactées par la présence des MP et des NP.

Des analyses en histopathologie digestive seront également effectuées chez les organismes exposés. Compte tenu de l'absorption des MP et des NP par les anguilles, une estimation des quantités ingérées par l'Homme pourra être calculée.

L'ensemble des expériences sera conduit dans le strict respect de la règle des 3 R.

R de remplacer : L'utilisation de méthodes alternatives, comme la culture cellulaire, sont incompatibles avec ce type d'étude, du fait de l'impossibilité de recréer une chaîne alimentaire, que seule une étude en mésocosme rend possible.

R de réduire : Le nombre d'animaux utilisé correspond au nombre minimum nécessaire aux analyses statistiques.

R de raffiner : Les poissons seront maintenus dans des conditions optimales d'élevage (90% et plus de saturation en oxygène, photopériode 14H/10H (J/N), cachettes, faible densité) et seront nourris ad libitum. Pendant toute la durée de l'expérimentation, le bien-être des individus sera vérifié quotidiennement (comportement, absence de pathologie). Les points limites les plus adaptés/précoces seront basés sur le comportement. Dans le cas où les animaux présenteraient des signes anormaux de comportement (absence de réflexe de fuite, nage désordonnée et permanente, individu posé sur le fond ou en surface et en hyperventilation, individu isolé qui n'est pas dans sa cachette lors de la phase de lumière, arrêt de la prise de nourriture) ou des signes externes de pathologies, ils seront anesthésiés puis euthanasiés dès l'apparition de ces premiers signes cliniques de souffrance.

**19896** L'étude du comportement est un des piliers permettant d'évaluer le bien-être animal, sujet au cœur des préoccupations sociétales actuelles.

S'il est reconnu que le comportement résulte à la fois d'un déterminisme génétique (composante innée) et de l'apprentissage (composante acquise), peu de données sont actuellement disponibles sur la possibilité qu'une part du comportement d'un individu puisse résulter de la transmission d'une réaction conditionnée par des conditions de vie des générations précédentes. Les conditions d'élevage utilisées à une génération peuvent-elles avoir des impacts (positifs ou négatifs) sur le comportement des animaux des générations suivantes ?

Ce projet vise à étudier la transmission d'un caractère acquis via un conditionnement classique chez le lapin. Le concept de conditionnement classique (ou conditionnement pavlovien) a été proposé par Ivan Pavlov au début de 20<sup>ème</sup> siècle.

Ce concept s'intéresse aux résultats d'un apprentissage dû à l'association entre des stimuli de l'environnement et les réactions automatiques de l'organisme.

Le conditionnement de Pavlov apparaît lorsqu'un stimulus neutre (SN) est présenté quasiment en même temps qu'un stimulus inconditionnel (SI). Le SI est choisi pour être aversif pour l'animal, qui aura pour réflexe de se cacher (Réflexe Inconditionnel RI).

SN → RN (stimulus neutre → réponse neutre ou absence de réponse)

SI → RI (stimulus inconditionnel → réponse inconditionnelle).

À force de répéter cette présentation (SN+SI), le stimulus neutre finira par déclencher le comportement avant l'apparition du stimulus inconditionnel : c'est le conditionnement de premier ordre. Le stimulus neutre devient un stimulus conditionnel (SC) et le Réflexe inconditionnel devient Réflexe Conditionné (RC).

SC → RC (stimulus conditionnel → réponse conditionnelle).

Ainsi, le conditionnement classique permet d'obtenir une réponse conditionnelle, provoquée par la mémorisation de l'association avec l'autre stimulus, de la part de l'animal soumis à un stimulus neutre (tel que de la musique par exemple), au contraire d'un animal non conditionné qui lui, exprimera une réponse neutre.

La réponse de l'animal soumis à un stimulus neutre nous informe sur son statut (conditionné ou non), et peut être vue comme un caractère acquis (opposé à un caractère inné).



Nous allons nous servir de ce concept afin d'étudier la transmission non génétique d'un caractère acquis par conditionnement chez le lapin.

La cage des animaux sera divisée en deux zones (Z1 et Z2) auxquelles l'animal a accès sans restriction.

Dans une première étape, nous allons établir les conditions du conditionnement des lapins à partir de 6 lots de 8 animaux grâce à l'association de 2 stimuli neutres et 3 stimuli inconditionnels différents, afin de choisir la combinaison optimale.

- Deux SN (son ou odeur) seront testés,

- Trois SI, plus ou moins faciles à mettre en place et a priori plus ou moins stressants, seront testés:

\* électricité : le stress viendrait d'une décharge électrique (généralisant de l'inconfort) sur la Z1 au niveau du sol (la Z2 ne serait pas électrifiée) ;

\* Air comprimé : le stress viendrait de l'air comprimé généré par un compresseur (généralisant de l'inconfort) sur la Z1 (la Z2 serait protégée) ;

\* Prédateur : un faux prédateur sera placé au-dessus de la cage et fondra sur celle-ci, engendrant de la peur (la Z2 sera recouverte pour créer un sentiment de sécurité).

La combinaison choisie permettra de conditionner les animaux de manière répétable tout en étant la moins impactante possible pour le bien-être de l'animal sur le long terme.

Dans une deuxième étape, nous appliquerons le conditionnement sélectionné à 40 animaux mâles et femelles. Dix couples d'animaux ainsi conditionnés nous serviront à obtenir cinquante-six descendants dits G1 (environ 3 mâles et 3 femelles pour chaque couple).

Nous testerons pour 8 animaux conditionnés (après la mise bas) et 8 animaux naïfs, l'effet d'une exposition au SN seul pour ces animaux. Nous serons ainsi à même de mesurer un éventuel effet de "stress communicatif" sur les animaux naïfs avant la troisième phase.

La troisième phase consistera à soumettre les 56 animaux G1 ainsi que 56 animaux naïfs au conditionnement. Nous pourrons ainsi comparer les deux groupes d'animaux sur le nombre de répétitions nécessaires au conditionnement. Si le groupe d'animaux G1 réagit au stimulus neutre dès la première présentation, nous pourrons considérer que le caractère acquis (réflexe conditionné) est transmissible.

Dans ce projet, nous mettrons en œuvre les principes des 3R de la façon suivante :

Réduction :

Le nombre d'animaux nécessaire au total pour cette expérimentation est de deux cent. Les 48 animaux (6 lots de 8) de la phase 1 sont le minimum afin de valider un protocole expérimental répétable. Quarante animaux sont ensuite nécessaires lors de la phase 2 : avec un taux de réussite de conditionnement supérieur à 50%, cela permettra de constituer 10 accouplements d'animaux conditionnés à l'issue de cette phase.

Les 112 animaux de la dernière phase sont quant à eux requis pour des raisons de puissance statistique. En effet, si on souhaite valider le test pour une différence d'au moins 20% de la fréquence à laquelle les animaux iront dans la Z2 nous obtenons une puissance de détection supérieure à 81% avec ces effectifs. Avec la moitié des effectifs la puissance statistique chute à 39%.

Remplacement :

Le recours aux animaux est indispensable dans la mesure où ce projet vise à étudier la transmission d'un caractère acquis chez les animaux d'élevage. Le statut de proie du lapin et son comportement associé est un levier fondamental du comportement du lapin, particulièrement adapté à notre expérimentation.

Raffinement :

Aucun prélèvement ne sera fait dans le cadre de ce projet sur les animaux. Ils ne seront isolés en cage individuelle que durant le processus de conditionnement (10 jours maximum). Il est important de noter qu'une fois les animaux conditionnés, ceux-ci ne subissent pas le stimulus aversif étant

donné que celui-ci ne sera appliqué que dans la Zone 1 de la cage. La mesure du conditionnement sera automatisée grâce à une caméra en dehors de la cage, ce qui permettra de limiter les contacts de l'expérimentateur avec les animaux, et les possibles interférences que cela peut occasionner sur le comportement des animaux.

Afin de souscrire de manière la plus complète possible aux « 3R », nous avons fait le choix de structurer le projet selon une structure hiérarchique avec « Go / No-Go ». En cas de résultat non concluant lors d'une phase, le projet sera stoppé.

Selon les résultats obtenus, plusieurs retombées peuvent être envisagées à l'issue de ce projet, afin de répondre aux besoins de diversification des systèmes d'élevage et des pratiques associées ou sur la façon de prendre en compte dans des études génétiques la transmission d'un caractère acquis.

**19897** La vasculopathie de transplantation (VT) est une cause majeure du rejet d'organe chez les patients transplantés. La VT se caractérise par un épaississement de la paroi des vaisseaux de l'organe greffé, résultant de la migration et la prolifération des cellules musculaires lisses (CML) qui envahissent progressivement la paroi vasculaire, induisant ainsi un rejet du greffon. L'immunité humorale est impliquée dans la VT, en particulier les anticorps (Ac) anti-HLA, et non-HLA. Ces Ac sont inflammatoires et stimulent la prolifération des CML, donc favorisent le développement de la VT.

Notre objectif est d'étudier le mécanisme par lequel ces Ac favorisent la VT sur un modèle murin de VT, afin de réaliser des approches thérapeutiques permettant de limiter ou inhiber le développement de la VT.

Pour cette étude, nous développons un modèle de VT utilisant des souris immunodéficientes à la fois sur le plan cellulaire et humoral, c.a.d. qu'elles n'ont pas de cellules immunitaires et ne produisent pas d'Ac (souris SCID/beige). Le modèle de VT consiste en la réalisation d'une greffe d'artère mésentérique humaine à la place de l'aorte abdominale de la souris. Les souris ne développent aucun rejet de l'artère humaine après la greffe. Cependant l'injection d'Ac anti-HLA (Ac pan anti-HLA W6/32) génère en quelques semaines un épaississement de la paroi vasculaire dans l'artère humaine greffée, comparable à celui observé chez les patients humains transplantés.

Chaque expérience de greffe est réalisée sur 8 souris mâles, âgées de 8 à 10 semaines. Une expérience-type comprend 2 souris dites "contrôles" injectées avec du sérum physiologique stérile, 2 à 4 souris injectées avec des Ac anti-HLA de classe I (W6/32) ou des Ac anti-HLA de classe II, et 2 souris injectées avec des immunoglobulines de même isotype que l'Ac anti-HLA injecté, mais inactives (Ig irrelevantes). On réalise une injection hebdomadaire de l'Ac par voie intra-veineuse, et ce pendant 5 semaines. Les approches thérapeutiques sont réalisées en traitant les animaux greffés et injectés avec l'Ac anti-HLA, avec des agents pharmacologiques pouvant limiter ou inhiber le développement de la VT. Dans ce cas, une expérience-type avec les agents inhibiteurs comprend 2 souris injectées avec le sérum physiologique stérile, 2 souris avec sérum physiologique et inhibiteur, 2 souris injectées avec l'Ac anti-HLA, 2 souris injectées avec Ac anti-HLA et inhibiteur. Les inhibiteurs sont administrés si possible dans l'eau de boisson, sinon par voie intrapéritonéale (1 à 3 injections par semaine maximum).

A la fin, les animaux sont sacrifiés et les artères humaines sont récupérées afin de caractériser et quantifier l'épaississement néointimal généré par l'injection des Ac anti-HLA.

Les études statistiques nécessitent au minimum 6 animaux par condition (contrôle, Ac-anti-HLA, Ig irrelevantes, inhibiteur...), et nous pensons pouvoir réaliser au moins 3 expérimentations de greffes par an, soit un besoin de 25 souris par an. Ce projet classé en procédure "sévère", devrait nécessiter autour de 125 souris sur 5 ans, en fonction des résultats obtenus et dans le respect de la règle des 3R ("replacement, reduction, refinement" c.a.d. remplacement, réduction, raffinement). La règle de remplacement sera appliquée dès que possible en effectuant des analyses sur une collection de cellules musculaires lisses primaires humaines traitées avec des anticorps anti-HLA de source commerciale ou provenant de patients greffés. Les résultats préliminaires ainsi obtenus, seulement

lorsqu'ils sont prometteurs, seront validés chez la souris. La règle de réduction s'applique des manières suivantes : dans la conservation des échantillons (blocs paraffine, plasmas) qui peuvent être analysés sur du long terme, afin de ne pas réaliser de greffes inutiles lorsque les résultats statistiques le permettent ; en utilisant strictement le nombre de souris par condition nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement pertinents malgré l'hétérogénéité attendue du fait de l'utilisation de différents donneurs humains. La règle de raffinement est appliquée en périodes pré, péri et post-opératoire, en garantissant au maximum la réduction de la douleur, de la souffrance et de la détresse animales (recours à l'analgésie, opération sur tapis chauffant, monitoring quotidien des animaux, enrichissement de l'environnement pendant l'hébergement). Ce modèle animal permet de générer des données pouvant être directement appliqués aux patients humains transplantés et favorisant ainsi la recherche de nouvelles thérapies.

**19898** La coccidiose, causée par des parasites du genre *Eimeria*, représente le premier fléau parasitaire de l'aviculture induisant des pertes de production ayant de graves conséquences économiques dues à de la mortalité mais surtout de la morbidité. L'infection par *Eimeria* conduit à une inflammation intestinale importante. Cependant, la nature des différents acteurs cellulaires et moléculaires ainsi que les mécanismes précis conduisant à cette inflammation nécessitent d'être mieux connus. En raison de la disponibilité plus importante d'outils dans le modèle souris, nous envisageons d'étudier plus finement la physiopathologie de l'infection par *Eimeria* dans ce modèle et de le valider dans le modèle poulet. Cette saisine est donc divisée en deux parties :

1) multiplication de souches d'*Eimeria* de souris : *Eimeria vermiformis* qui colonise l'intestin grêle et *Eimeria falciformis* qui colonise le caecum et le colon.

2) étude de la physiopathologie de l'infection par l'utilisation de différentes lignées de souris.

Cette demande concerne l'utilisation du modèle expérimental murin de l'infection par *Eimeria* (souris adultes, conventionnels ou génétiquement modifiés présentant une déficience immunitaire) pour des études en immunologie, ayant pour but l'identification des mécanismes immunitaires protecteurs. Cette demande sur 5 ans représente environ 2750 souris dont 750 souris utilisées pour la multiplication de *E. falciformis* et *E. vermiformis* sur 5 ans et 2000 souris maximum sur 5 ans. Une expérimentation type est constituée d'un minimum de 2 lots : un lot de souris infectées génétiquement modifiées (30 souris sacrifiées à 3 temps différents) et un lot de souris conventionnelles (30 souris sacrifiées à 3 temps différents), et 20 souris adultes sauvage (wild type, WT) et génétiquement modifiées non infectées (control négatif pour les analyses des paramètres de l'inflammation) ce qui fait une moyenne maximale de 80 souris adultes par expérience type à raison de 4 lignées génétiquement modifiées et une lignée WT par an.

Sur chaque année, une moyenne de 4 lignées de souris génétiquement modifiées par an et par espèce parasitaire. Selon les résultats et les expérimentations (exemple de tri cellulaire en cytométrie pour lesquels tous les échantillons ne peuvent pas être traités en même temps), des répliques avec ces mêmes lignées pourraient être envisagées.

Dans ce projet la règle des 3R est respectée comme suit :

**Remplacement** : la multiplication des *Eimeria* et l'étude de la physiopathologie de l'infection ainsi que le rôle de différents médiateurs et cellules immunitaires dans la physiopathologie de l'infection nécessite l'utilisation d'animaux et ne peut être réalisée *in vitro*.

**Réduction** : Le nombre d'animaux par lot est adapté aux buts de cette expérimentation en réduisant au maximum acceptable statistiquement.

**Raffinement** : Les souris seront hébergées en cages adaptés à leur taille, dans des conditions environnementales réglementaires, avec nourriture et eau à volonté. Un dispositif d'un enrichissement social et comportemental (papier sopalin pour construction d'un nid, plateforme) est mis en place. Quand les souris sont en cage individuel, ce temps est réduit au maximum et les cages sont placées de manière à ce que les souris puissent se voir à travers les parois et se sentir.

**19899** 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 (lignées pures génétiquement homogènes, environnement "contrôlé") qui reproduisent en majeure partie les caractéristiques cliniques et histopathologiques des maladies humaines. De plus, il est tout à fait possible d'appliquer les résultats obtenus dans les modèles animaux à la pathologie humaine.

Les approches d'immunothérapie visant à stimuler les récepteurs « points de contrôle immunitaire » (IC) exprimés sur les lymphocytes T (LT) constituent un axe thérapeutique prometteur dans le traitement des maladies auto-immunes. Des protocoles cliniques visant à stimuler ces récepteurs sont mis en place dans le traitement de ces maladies, mais les mécanismes moléculaires sous-jacents déterminant leur efficacité restent incompris. Des résultats préliminaires de notre équipe suggèrent qu'une nouvelle protéine, appelée THEMIS, pourrait moduler l'efficacité des traitements ciblant les IC. Ce projet vise à étudier plus avant l'impact de THEMIS sur la modulation des réponses auto-immunes des LT et sur l'efficacité des immunothérapies ciblant les IC dans un modèle murin de sclérose en plaques.

Pour répondre à l'objectif du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 1920 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 études *in vitro* dans des modèles cellulaires. Le principe de remplacement n'est pas applicable à ce projet car les études *in vitro* ne reproduiraient pas l'ensemble des interactions et 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 :

Les modèles murins utilisés, nous permettront d'optimiser l'utilisation des animaux en combinant le suivi clinique et l'analyse fonctionnelle *in vitro*, sur un même animal. Ce design de l'étude permet de réduire le nombre à 10 ou 20 souris par lot selon les paramètres à évaluer, afin d'acquérir des données fiables. 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 rajouté dans les cages, sous la forme de boules de coton, de papiers absorbants, de tubes en carton, permettant aux animaux d'avoir une activité et de faire une nidation. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Pour chaque procédure des points limites ont été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'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.

**19900** Durant le développement cérébral, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte, la croissance et la migration des neurones ainsi que la mise en place des connexions entre les neurones (synapses) sont des événements absolument critiques qui permettent de créer un réseau neuronal opérationnel à l'âge adulte. Ces processus sont en partie gérés par TRIO, une protéine activatrice des Rho GTPases, qui joue un rôle régulateur clé dans la migration cellulaire et la croissance/guidage axonal des neurones.

Le gène TRIO est un nouveau gène à risque pour l'apparition de troubles neurodéveloppementaux. En effet, les patients ayant une mutation dans le gène TRIO, notamment la mutation nommée R1078W, présentent une déficience intellectuelle sévère ainsi que des troubles du spectre autistique et des troubles moteurs.

Nous avons largement caractérisé cette mutation *in vitro*, et montré qu'elle conduit à une altération morphologique et fonctionnelle des neurones à la fois lors du développement précoce, et plus tardif chez des neurones de souris en culture. Pour aller plus loin dans la compréhension de cette mutation de TRIO, une étude *in vivo* est nécessaire.

Le but de ce projet de recherche fondamentale est de 1) caractériser l'impact global de la forme mutante Trio-R1078W par rapport à la forme normale sur le développement du système nerveux et 2) tester des possibles voies d'intervention pour reverser les effets délétères de la mutation. A ces fins, nous avons créé une souris knock-in pour la mutation TRIO R1078W qui servira comme modèle pour des études de comportement et d'électroencéphalographie (EEG, étude de l'activité électrique cérébrale).

Le nombre de souris utilisées dans ce projet sera de 640. Conformément à la règle des 3R, l'utilisation d'un modèle animal ne peut pas être remplacée car seule une étude *in vivo* permet d'identifier le mécanisme d'action de TRIO-R1078W. Le nombre d'animaux nécessaires sera réduit au maximum. Nous utiliserons des mâles et des femelles dans nos procédures expérimentales car des différences ont été observées dans le développement des symptômes chez les garçons et les filles porteur de la mutation.

Les 3R seront respectées de la façon suivante:

Réduire: le nombre d'animaux prévu a été déterminé afin n'utiliser que le minimum nécessaire pour une significativité statistique. De plus, nous allons travailler par paliers et, si la première phase d'analyse ne montrera pas de différence entre les animaux sauvages et les animaux porteurs de la mutation sous étude, nous arrêterons l'étude.

Remplacer: une partie importante de l'étude de la mutation du gène Trio a été effectuée sur des système de culture cellulaire.

Raffiner: 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 pour les animaux utilisés pour les mesures d'activité électrique cérébrale. 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. 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.

**19901** Le retard de croissance intra-utérin (RCIU) complique 5-10% des grossesses dans le monde et est impliqué dans 32% de la mortalité autour de la naissance. Les causes les plus fréquentes sont les infections, les anomalies génétiques et les anomalies du placenta. Le retard de croissance sévère et précoce augmente les complications et la mortalité autour de la naissance mais a aussi un impact

sur le développement cérébral et comportemental à plus long terme, dû à une inflammation du cerveau. La prise en charge actuelle de ces fœtus consiste en une surveillance rapprochée pour déterminer le meilleur moment d'accouchement. Les outils de surveillance incluent une surveillance clinique par enregistrement du rythme cardiaque fœtal et une surveillance échographique des flux sanguins fœtaux et placentaires. Le RCIU tardif au troisième trimestre de la grossesse présente lui aussi des complications fœtales mais reste difficile à diagnostiquer en échographie. Il est donc nécessaire d'améliorer nos outils échographiques de surveillance, de diagnostic et de pronostic pour permettre une meilleure prise en charge de cette pathologie. L'échographie ultrarapide (fUS) est une nouvelle technique d'imagerie échographique à très haute résolution qui a permis d'améliorer l'échographie des flux sanguins cérébraux chez le fœtus en développement mais également chez l'animal après la naissance et adulte.

Le but de cette étude est donc de caractériser dans un modèle de RCIU chez le rat les atteintes placentaires et cérébrales en fUS. Le modèle de RCIU utilisé est induit par un régime hypocalorique tout le long de la gestation.

Les rates seront réparties en deux groupes : un soumis au régime hypoprotidique et un autre en régime normal. Chacun de ses groupes subira pour la moitié une échographie conventionnelle et l'autre moitié une échographie fUS.

Un groupe de rates gestantes subira une échographie à plusieurs temps au cours de la gestation sous anesthésie générale avec un rasage cutané et la pose d'une sonde sur la paroi abdominale. Elles seront ensuite euthanasiées par une injection de médicament à dose létale. Les rats mâles et femelles seront récupérés post-mortem et euthanasiés pour permettre le prélèvement et l'analyse de leur cerveau et du placenta.

Un autre groupe de rates gestantes subira des échographies fUS au cours de la gestation sous anesthésie générale après rasage cutané et incision de quelques centimètres du flanc. La sonde d'échographie sera posée avec du gel préchauffé sur la poche amniotique des rats. L'environnement sera maintenu à une température suffisante à l'aide de lampes chauffantes.

Des manipulations seront réalisées avec l'injection de produit de contraste dans la queue de la rate. Une autre série d'expériences sera réalisée avec l'administration d'oxygène à travers un masque adapté. Les rates seront ensuite euthanasiées par une injection de médicament à dose létale. Les rats mâles et femelles seront récupérés post-mortem et euthanasiés pour permettre le prélèvement et l'analyse du cerveau et du placenta.

Ce modèle expérimental est de sévérité modérée.

Nombre d'animaux utilisés : il est prévu d'utiliser 64 rates gestantes. La durée totale du projet est de 4 ans.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la réglementation des 3R :

- Remplacer : Les expérimentations *in vivo* sont nécessaires pour étudier le développement cérébral et placentaire qui ne sont pas analysables par des expérimentations alternatives. En effet, l'interaction entre le développement cérébral et placentaire au cours de la gestation est complexe. A notre connaissance, il n'existe pas de modèle *in vitro* suffisamment complexe pour évaluer cette relation.

- Réduire : La bonne reproductibilité et le taux de mortalité (5%) de ce modèle expérimental permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe nécessaire à la réalisation d'analyses statistiques. L'analyse statistique de nos données nécessite 64 animaux pour mettre en évidence une différence significative. Si nos résultats étaient significatifs avec un nombre plus restreint d'animaux, nous diminuerions la quantité d'animaux. Ce nombre minimum nous permettra d'être certains de répondre aux questions scientifiques de ce projet.

- Raffiner : Le modèle RCIU utilisé est non invasif et repose seulement sur la mise à disposition d'une nourriture hypocalorique pour les rates gestantes. Les animaux seront suivis par le personnel qualifié de l'animalerie, avec attention à l'aspect, la mesure du poids et de la quantité de nourriture ingérée pour les femelles gestantes. La mise en place de points limites ainsi que l'observation journalière 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.

**19902** L'épithélium intestinal est une barrière dynamique qui limite l'accès des bactéries, des parasites, des virus mais aussi de certaines molécules chimiques aux tissus de l'hôte. De nombreuses pathologies sont associées à une altération de la perméabilité intestinale telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (ou MICI), l'obésité, la sclérose en plaques, maladie de Charcot et Alzheimer. Cette altération conduit à une augmentation de la perméabilité intestinale aboutissant le plus souvent à une inflammation de la paroi de l'intestin. Peu de traitements permettent aujourd'hui de traiter l'inflammation intestinale et de conduire à une remédiation de la perméabilité intestinale. On peut citer les corticoïdes, immunosuppresseurs, biothérapies, ou bien dans les cas les plus sévères la chirurgie. Ces traitements sont efficaces mais restent lourds pour le patient avec de nombreux effets secondaires (ostéoporose, effet neuropsychiatrique...). De nouvelles stratégies thérapeutiques à base de polylysine pourraient être prometteuses. L'objectif principal du projet est de mettre en évidence l'efficacité d'une solution de polylysine sur la remédiation de la perméabilité intestinale suite à l'induction d'une inflammation intestinale chronique à l'aide de Dextran Sulfate de Sodium - DSS. Pour tester ces hypothèses, des rats recevront, par injection sous cutanée, différentes doses de polylysine, avant et après induction de l'inflammation intestinale.

Dans le cadre de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été réduit au minimum (42 animaux au total) dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet et afin d'assurer des résultats statistiquement significatifs. Les animaux seront élevés dans des cages (3 animaux par cages) avec libre accès à l'eau et la nourriture. Un enrichissement sera mis à disposition dans les cages (tunnels, petit abris). Les signes de douleur seront mis en évidence par un comportement inhabituel de l'animal (posture voutée ou recroquevillée, locomotion diminuée ou vocalisation lors de la palpation de la zone d'injection) ou par la présence régulière de porphyrine autour des yeux et du nez. Deux jours après l'apparition des signes cliniques, l'animal concerné sera traité avec du paracétamol qui lui sera administré par gavage 2 fois par jours. Ces animaux seront sortis du schéma expérimental. Si une perte de poids importante est observée, les animaux seront sacrifiés lorsqu'ils atteindront 85% de leur poids initial. Un suivi journalier des poids des animaux, de la consommation d'aliment et de l'eau est également prévu pour repérer des signes de stress ou de douleur.

Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance. L'utilisation de rats a été validée par notre établissement et est nécessaire pour répondre à la problématique du projet et mimer au mieux la physiologie intestinale des patients atteints d'une augmentation de la perméabilité. Aucune méthode alternative basée sur l'utilisation de tissu *in vitro* ne permet de répondre à la problématique car l'inflammation résulte d'une réponse de l'animal entier. Ces études précliniques chez l'animal restent également nécessaires à la poursuite d'études cliniques pour développer de nouveaux traitements.

Différentes analyses seront réalisées sur les animaux des différents groupes (témoin vs. traitement) : - poids, - analyse des fèces. Après le sacrifice, un maximum de prélèvements seront réalisés de façon à optimiser au mieux l'utilisation de ces animaux.

**19903** Les cancers de la sphère ORL forment un ensemble hétérogène de tumeurs pour lesquelles les modalités thérapeutiques conventionnelles comportent la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. Ces traitements sont agressifs, avec de nombreux effets secondaires qui impactent très négativement la qualité de vie des patients, et malgré cela, le pronostic de ces tumeurs reste sombre, avec une survie globale à 5 ans inférieure à 50%. Très récemment, les immunothérapies (qui visent à mobiliser le système immunitaire du patient contre la tumeur) ont été développées pour la prise en charge des patients avec une tumeur ORL. Ces alternatives thérapeutiques peuvent provoquer des réponses tumorales complètes et de longue durée, mais ce uniquement chez environ 20% des patients. Nous souhaitons évaluer l'hypothèse qu'un traitement de ces cancers avec des

thérapies ciblées déjà utilisées dans la pratique clinique puisse provoquer une mort cellulaire particulière qui stimule le système immunitaire. Cette mort cellulaire, dite immunogène, pourrait à son tour stimuler la réponse aux immunothérapies et en augmenter l'efficacité.

Remplacement: Après plusieurs travaux *in vitro* très encourageants, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable. En effet, la démonstration la plus robuste de ces phénomènes repose sur la vaccination de modèles animaux. La démonstration de la mobilisation de la réponse immunitaire en réponse au traitement est impossible *in vitro*, et demande l'utilisation de souris immunocompétentes, chez lesquelles le déclenchement d'une réponse immunitaire anti-tumorale est réalisable par des expériences de vaccination. Ainsi, les enjeux de ce projet sont la démonstration de l'efficacité *in vivo* de cette modalité thérapeutique, qui pourra à terme trouver une application dans l'amélioration de la prise en charge des patients.

Réduction: Le projet nécessitera un nombre maximum 212 souris. Ce nombre a été réduit au maximum tout en restant suffisant et statistiquement robuste pour apporter des réponses claires à notre projet.

Raffinement: Les souris seront hébergées dans des conditions sanitaires contrôlées en disposant d'un enrichissement adapté (carrés de coton pour la fabrication des nids ainsi que des tunnels ou maisonnette). Les animaux sont surveillés quotidiennement comme l'exige la réglementation en vigueur. Un suivi régulier comprenant l'observation de critères définis (poids, taille des tumeurs, état général) sera effectué. Des points limites ont été définis (taille de la tumeur par exemple) permettant de soustraire l'animal au protocole limitant ainsi dans le temps la souffrance et le stress potentiels.

**19904** Les douleurs neuropathiques représentent un problème majeur dans notre société actuelle : plus d'un adulte sur cinq souffrirait de douleur neuropathique en Europe. Si les causes des douleurs neuropathiques peuvent être diverses (lésion d'un nerf, les conséquences de médicaments anti-cancéreux, le diabète...), les symptômes sont souvent similaires comme l'apparition d'une allodynie mécanique (sensibilité accrue au toucher), une allodynie au froid ou une hyperalgésie thermique.

Aujourd'hui, les molécules permettant de diminuer ces symptômes ne sont malheureusement pas toujours efficaces et présentent le plus souvent une accommodation les rendant au cours du temps inefficace. L'identification de nouvelles molécules pourrait à terme améliorer le confort de patients atteints de douleurs neuropathiques.

Dans ce cadre, nous allons tester différents composés contre un récepteur nouvellement identifié comme une cible thérapeutique prometteuse sur un modèle de douleur neuropathique chez la souris. Des études récentes ont montré que des souris dont le gène codant pour ce récepteur a été inactivé, ne développent pas de douleur neuropathique prouvant ainsi l'implication de celui-ci dans les mécanismes de douleur neuropathique. Les différents composés qui seront analysés ont déjà été testés pour leur activité inhibitrice sur des modèles *in-vitro*. Le recours à l'utilisation d'animaux est maintenant nécessaire pour appréhender son potentiel effet analgésique sur des modèles de douleur dans un contexte physiologique.

Les différents inhibiteurs seront testés sur un modèle de douleur neuropathique qui consiste en la constriction modérée du nerf sciatique (CCI) et qui est couramment utilisé dans les études pré-cliniques. Ce modèle de douleur neuropathique chez la souris mime les symptômes de la sciatique chez l'Homme. La sensibilité au toucher des animaux sera déterminée grâce à l'utilisation de filaments de Von Frey calibrés.

Nous prévoyons trois études dans lesquelles différents composés seront testés. Pour chacune des études, nous utiliserons 6 lots de 10 animaux chacun : 3 lots traités avec 3 composés différents ou un même composé à 3 concentrations différentes, un lot contrôle négatif traité avec le véhicule, un lot contrôle positif traité avec la prégabaline, ainsi qu'un lot d'animaux témoin dit "sham" (ayant subi la chirurgie mais sans que la constriction du nerf sciatique ait été mise en place).

Pour chacune des trois études, 73 animaux sont prévus (63 pour la mise en place du modèle CCI + 10 animaux "sham") : ce nombre inclue un taux d'échec, estimé à 20% maximum, possible lors de la mise en place de ce modèle. Cette chirurgie est relativement délicate et une constriction un



peu trop forte entraîne alors une insensibilité de la patte. En tout, 219 animaux seront donc nécessaires.

Les personnes affectées au projet sont formées et qualifiées à l'expérimentation animale (formation B). De plus, le responsable a suivi la formation chirurgie et possède l'expertise pour la réalisation de cette chirurgie délicate.

Réduction : Les procédures décrites sont maîtrisées par les expérimentateurs. L'utilisation d'outils statistiques nous a permis d'estimer au mieux le nombre d'animaux nécessaires.

Remplacement : les différents composés ont déjà été testés pour leur activité inhibitrice sur des modèles in-vitro. Le recours à l'utilisation d'animaux est maintenant nécessaire pour appréhender son potentiel effet analgésique sur des modèles de douleur dans son contexte physiologique.

Raffinement : 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 permettant le raffinement de l'environnement. Nous utilisons alternativement des carrés de ouates pour que les animaux puissent faire un nid, des dômes en cellulose ou des tunnels en carton, qui sont changés chaque semaine. Les élevages sont effectués au sein d'un établissement agréé où 5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages et ainsi tous les jours l'état sanitaire et environnemental des animaux est contrôlé. De plus, le week-end, la personne en charge du projet sera d'astreinte pour le suivi des animaux. D'autre part, bien que des analgésiques ne pourront être utilisés lors des tests (à juste titre, nous voulons valider l'effet analgésique de ces nouveaux inhibiteurs sur un modèle de douleur neuropathique), le recours aux analgésiques est prévu dans le cas où le niveau de douleur/souffrance deviendrait important. Nous avons recours à l'anesthésie/analgésie lors du procédé chirurgical et des soins pré-, per- et post-opératoires adéquats sont administrés.

**19905** Plus de 70% des cancers sont aujourd'hui guéris par la chirurgie qui demeure le traitement de référence en la matière. Les autres modalités thérapeutiques de l'arsenal classique sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Bien que des progrès sans cesse croissants soient réalisés en termes d'efficacité des traitements et de réduction des effets secondaires, la nécessité de développer d'autres approches thérapeutiques persiste. Au cours des deux dernières décennies, l'immunologie des cancers a connu des avancées fondamentales qui se sont traduites en applications cliniques. Ainsi, l'émergence de nouveaux concepts a fait de l'immunothérapie une 4<sup>ème</sup> modalité de traitement du cancer après les traitements conventionnels. Ceci s'inscrit dans un nouveau paradigme où l'on admet que l'échappement à l'immunosurveillance est une nouvelle caractéristique fondamentale dans l'émergence des cellules cancéreuses. Par ailleurs, la thérapie photodynamique (PDT) est une voie de traitement innovante qui pourrait être employée en complément de la chirurgie. La PDT antitumorale est une technique de traitement basée sur l'association de molécules photosensibilisatrices (PS) capables de se concentrer dans les cellules cibles, et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée. La PDT anti-tumorale émerge comme une nouvelle modalité de traitement efficace avec un nombre croissant d'essais cliniques de faisabilité sur divers modèles d'études (Glioblastome, Mésothéliome, Mélanome, etc.). De plus, il est aujourd'hui admis que la PDT agit en faveur d'une activation du système immunitaire qui, à l'instar d'une vaccination in-situ, favoriserait une protection des individus à long terme.

Notre projet vise ainsi deux objectifs complémentaires : comprendre les aspects fondamentaux des interactions entre les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires qui mènent à l'immunorégulation des cancers ; et ainsi mettre en application ces découvertes pour le développement de nouvelles approches d'immunothérapie anti-cancéreuse, efficaces et complémentaires. L'importance de cellules régulatrices (cellules T-régulatrices, cellules dendritiques tolérogènes, etc.) dans le développement des cancers n'est plus aujourd'hui à démontrer. Les preuves se sont accumulées ces 15 dernières années quant au rôle prépondérant que ces cellules jouent sur le développement tumoral, en favorisant la croissance et la dissémination. Il existe un lien étroit entre les cellules tumorales et les régulatrices, tant et si bien que ces dernières représenteraient un facteur pronostic efficace pour déterminer le devenir de la

pathologie. Ainsi les cellules régulatrices ont naturellement émergé en tant que cibles thérapeutiques de choix dans la lutte anti-cancéreuse.

Ce projet permettra de mettre en place de nouveaux modèles de chimères de souris humanisées qui répondent aux critères physiopathologiques de différents cancers étudiés. Il s'agit d'abord de reconstituer le système immunitaire de souris immunodéficientes (SCID) à partir de cellules immunitaires humaines, pour former le modèle SCID-Hu-PBL. Ces souris seront secondairement xenotransplantées avec des cellules issues de lignées tumorigènes humaines représentatives de différents cancers d'intérêt thérapeutique (eg. HuH7/Carcinome Hépatocellulaire, MDA/ Cancer du sein, SKOV3/Cancer Ovarien, C666-1/Carcinome du Nasopharynx, etc.) exprimant ou non la luciférase pour un suivi de la croissance tumorale. Ce modèle humanisé nous permettra alors d'évaluer l'activité cellulaire du système immunitaire humain, activé ou réprimé par divers molécules d'intérêt immuno-thérapeutique (anticorps monoclonaux, petites molécules de thérapies ciblées, etc.) ou de traitement par PDT ou bien encore par combinaison de ces diverses modalités, tout en réalisant des tests immunodiagnostiques.

Pour réaliser ces expériences, un nombre total maximal de 1 320 animaux est requis pour 5 années.

Les protocoles ont été établis en suivant la règle des 3 R : « Remplacer, Réduire, Raffiner »

-Le nombre des souris a été réduit de façon à obtenir une validation statistique des résultats. Les connaissances déjà acquises sur le modèle nous permettent également de réduire un minimum le nombre d'animaux nécessaires à une conclusion scientifique.

-Le protocole a été raffiné en développant, grâce à l'expérience antérieure du laboratoire, un suivi non dangereux des souris tout au long de l'expérience. Ce suivi sera complété par un suivi du bien-être des animaux en observant le poids des souris et leur comportement. Enfin, ce suivi strict des animaux associé à la bonne connaissance des modèles pathologiques étudiés nous permettra d'éviter le développement inutile de masses tumorales et de respecter les règles éthiques en vigueur. A ce jour, il y a impossibilité de remplacer cette étude par un autre moyen pouvant reproduire la réponse physiologique complète de l'organisme suite au traitement Immunothérapie, de PDT ou de combinaison. Il faut noter à cet égard que l'effet des modalités envisagées (Immunothérapie, PDT ou combinaison) a été ou sera préalablement évalué *in vitro* sur des lignées cellulaires équivalentes, et des modèles 3D d'organoïdes.

**19906** Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer dans le monde et la découverte de nouveaux traitements représente un enjeu 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. Nous désirons connaître les mécanismes de résistance au traitement le plus utilisé dans les cancers bronchiques. Nous étudierons l'effet de différents traitements sur la tumeur en analysant les différentes populations cellulaires présentes. Pour ce projet nous souhaitons utiliser 322 souris, réparties en plusieurs expériences pour la faisabilité technique en aval. Comme expliqué ci-dessous, ce chiffre tient compte de l'application de la règle des 3R:

-« 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.

- « 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 appropriées dans le respect des 3R. L'enrichissement des cages se fait avec des briques de peuplier ou des carrés de cellulose aidant à la prise en charge des contraintes subies au cours des procédures expérimentales telles que l'induction du développement tumoral. Un suivi quotidien des animaux sera donc effectué à ce stade ainsi qu'une imagerie mensuelle de ces animaux pour identifier

l'apparition de tumeur bronchique et prévenir l'apparition de signes de souffrance causés par la progression tumorale comme une détresse respiratoire. Tout le long de l'expérience, nous serons attentifs au bien-être des animaux et veillerons à ce qu'aucun ne dépasse le point limite points limites en considérant les items tels que la difficulté respiratoire, la perte de poids, le pelage et leur score associé, comme mentionné dans la fiche de suivi des animaux.

**19907** Les mastocytes et basophiles sont des cellules présentes dans les tissus comme la peau et dans le sang qui jouent un rôle important dans les réponses allergiques et inflammatoires. Leur activation dépend d'un certain type d'anticorps qui sont les Immunoglobulines de type E (IgE). Ces IgE peuvent se fixer sur les mastocytes et basophiles, puis peuvent les activer quand elles sont complexées par une substance déclenchant la réponse inflammatoire. L'activation des mastocytes et basophiles engendre la sécrétion d'un grand nombre de médiateurs inflammatoires responsables des symptômes allergiques. Dans le cas d'une activation inappropriée, par exemple suite à la formation de complexes IgE avec un produit habituellement inoffensif (appelé allergène ou produit inflammatoire), les symptômes des maladies allergiques et inflammatoires se développent. La compréhension des mécanismes de l'activation cellulaire des mastocytes et basophiles qui mène à la sécrétion des médiateurs inflammatoires par le couple IgE/allergène représente donc un enjeu majeur pour élaborer de nouvelles stratégies d'intervention thérapeutiques. Les expériences menées consistent donc à fixer les IgE sur des mastocytes et basophiles de culture cellulaire, puis d'étudier les mécanismes d'activation cellulaires par les IgE complexées avec des substances pro-inflammatoires. La connaissance de ces mécanismes permet dans la suite de concevoir de nouveaux inhibiteurs qui bloquent par exemple directement la fixation des IgE sur les cellules, la reconnaissance des allergènes ou encore le processus d'activation cellulaire déclenché.

Un réactif essentiel pour mener ses expériences est une IgE ayant une spécificité pour un allergène connu (appelé DNP), mais elle n'existe pas dans le commerce. Cette IgE anti-DNP mime l'effet des IgE pathologiques dans les maladies allergiques et inflammatoires. Pour pouvoir mener des expériences il faut donc produire ces IgE en grande quantité et de manière suffisamment pure à partir des cellules qui le sécrètent de manière continue. Actuellement, le seul moyen pour obtenir une IgE hautement purifiée est la production à partir d'un liquide d'ascite chez la souris. Conscient des règles de remplacement les animaux des essais de procédures de substitution (culture en bioréacteur en fibres creuses) pour obtenir ces IgE ont été menés. Néanmoins, les cellules productrices ne fournissant que des très faibles quantités. Ainsi, les essais de purification n'ont pas permis d'obtenir une IgE de qualité acceptable puisque la présence de substances contaminants interfère avec les essais d'activation cellulaire. Le seul moyen connu est donc la production de liquide d'ascite pour avoir des résultats satisfaisants. Dans l'année à venir la procédure ne pourrait pas être remplacé par une méthode alternative. Néanmoins, de nouveaux essais seront mené pour améliorer la technique de production notamment en cherchant à obtenir une cellule hautement productrice par enrichissement. L'espoir est donc de s'affranchir dans un futur proche de la production par liquide d'ascite et de la remplacer par une production n'impliquant pas des animaux. Le protocole proposé à partir d'un liquide d'ascite chez la souris est un protocole qui permet de minimiser l'inconfort et la souffrance de l'animal. Les injections des produits (substances inflammatoires, cellules productrices) et la ponction finale (une prise unique) de liquide d'ascites sont effectuées sous anesthésie. Pendant toute la production, qui s'étire sur une période de 17 à 19 jours (J0 une injection i.p. d'un produit inflammatoires pour créer des conditions de la prise de cellules ; J7 une injection d'un million de cellules productrices et J17 une ponction du liquide d'ascite, le délai de 17 jours peut être prolongé 48h au maximum si la production est retardé), les animaux sont surveillés étroitement deux fois par période de 24h (y compris les weekends) pour toute signe de souffrance suivant une grille prédéterminé pour les points limites (état prostré, yeux fermés, suivi du poids) à ne pas dépasser. A partir du développement visible du liquide ascite la surveillance est renforcé à trois fois par 24h. En générale, nous obtenons une quantité satisfaisante 10 jour après injection des cellules productrices par ponction unique avant d'euthanasier les animaux. Au total nous estimons à 16 animaux le nombre total de souris nécessaires pour obtenir environ 10 mg d'IgE purifiées pour un an. Ce projet est conforme aux règles des 3R : 1) Remplacer : comme indiqué en

haut, il n'est pas possible actuellement de remplacer la procédure par une méthode alternative, mais des nouveaux essais d'amélioration de production *in vitro* seront menés avec l'espoir de pouvoir s'affranchir de l'expérimentation animale 2) Réduire : nous limiterons le nombre d'animaux au minimum requis pour obtenir la quantité suffisante d'IgE. 3) Raffiner : Les souris sont hébergées dans un environnement adapté et enrichi. Pour réduire toute angoisse, toute souffrance et douleur associées aux procédures expérimentales les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, yeux fermés, suivi du poids) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée.

**19908** Caractérisée par une dégénérescence lente et progressive la maladie d'Alzheimer (MA) est la forme multifactorielle de démence sénile la plus fréquente. Avec le vieillissement constant de la population. Pouvoir déchiffrer les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de cette pathologie neurodégénérative représente un enjeu de santé publique et un défi pour la recherche médicale.

Récemment, l'implication d'un nouveau gène dans la maladie d'Alzheimer a été identifiée. La souris dont le gène a été invalidé présente un comportement anormal accompagné par des déficits cognitifs qui peuvent être évalués à 2 mois, avant que les animaux présentent un dysfonctionnement visuel et olfactif. De plus, une réduction de la potentialisation à long terme (LTP) qui s'accompagne d'une réduction du métabolisme de l'hippocampe a été observée chez ces souris. Le gène a été localisé au niveau de l'area postrema mais l'identité des cellules qui l'expriment est encore inconnue. L'area postrema (AP) s'est avéré être impliqué dans plusieurs mécanismes homéostatiques tels que vomissements, tension artérielle et alimentation mais l'activité neuronale AP n'a pas encore été complètement étudiée. Plusieurs types de neurones sont présents au niveau de l'AP qui sont activés par différentes hormones produits en périphérie comme glucagon-like peptide 1 (GLP1), amylin, ghrelin and différentiation factor 15 (GDF15). L'objectif de ce projet est d'activer les différentes populations neuronales via les hormones et leurs analogues afin d'identifier quels sont les neurones qui expriment le gène *Nxn12* dans l'AP.

Au total 96 animaux seront nécessaires à ce projet.

Le projet sera réalisé en respect de la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner. Remplacer : Nous avons choisi d'effectuer une approche *in vivo* car la stimulation hormonale nous permettra d'activer sélectivement les différentes populations neuronales que nous pourrions ensuite étudier par comparaison avec l'expression de la bêta galactosidase de notre modèle *Nxn12R/+*. Ce type d'étude ne permet pas de remplacer l'utilisation des animaux par des méthodes *in vitro*. Réduire : Les tests statistiques non paramétriques comme Mann-Whitney, Kruskal Wallis, Chi2 nous permettront de réduire au maximum le pool des animaux utilisés pour atteindre l'objectif scientifique fixé dans ce projet. Raffiner : toutes les souris auront à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Pour veiller au bien-être de l'animal l'utilisation d'anesthésie ainsi que des points limites adaptés seront mis en place. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries.

**19909** Le syndrome d'Ondine est une maladie génétique rare, constatée dès la naissance : le nouveau-né présente une hypoventilation (diminue sa respiration) parfois jusqu'à l'arrêt complet de la respiration pendant le sommeil. Une caractéristique majeure de la maladie est l'absence du réflexe d'augmentation de la respiration à l'inhalation de gaz carbonique (réponse au CO<sub>2</sub>). La maladie est provoquée par une mutation d'un gène déterminant dans le contrôle des grandes fonctions vitales comme la respiration. Actuellement, la seule prise en charge chez les patients est une ventilation mécanique pendant le sommeil et à vie. Proposer un traitement pharmacologique permettrait alors de réduire le recours à la ventilation mécanique et ainsi les risques dus à un arrêt accidentel pendant le sommeil ou à une ventilation inadaptée.

Un modèle génétique murin récapitule les caractéristiques de la maladie : hypoventilation et absence de réponse au CO<sub>2</sub>. Ce modèle a permis de confirmer le rôle nécessaire d'une structure importante pour la réponse au CO<sub>2</sub> et qui est probablement absente chez les patients. La mutation conduit à une létalité des souriceaux dans les heures qui suivent la naissance.

Nous supposons que la toxicité de la mutation affecte la fonction d'autres structures respiratoires exprimant le gène muté. L'analyse des gènes exprimés dans chacune des deux structures candidates a montré une dérégulation d'une signalisation importante chez les mutants et nous pensons qu'une action pharmacologique pourrait compenser la dérégulation et améliorer la respiration des mutants à la naissance.

Le projet s'étend sur 24 mois, comporte deux procédures et nécessite l'utilisation de 320 animaux.

Procédure 1 : Il s'agit de préciser au niveau tissulaire (étude histologique) la dérégulation sur tissus cérébral de 10 fœtus mutants et 10 fœtus témoins (20 animaux au total) au 18,5e jour embryonnaire après césarienne de la mère : marquage de la molécule et de ces récepteurs. Les mères sont euthanasiées avant la réalisation de la césarienne pour la procédure 1.

Procédure 2 : Action pharmacologique pour corriger la respiration des souriceaux mutants à la naissance. Nous mesurons la respiration des souriceaux à la naissance après administration unique d'une molécule par voie intrapéritonéale sur les animaux vigiles. Cinq doses de cette molécule sont testées et à chaque dose 30 souriceaux mutants et 30 souriceaux témoins. Au total, 300 animaux seront nécessaires. Ces doses sont documentées et non toxiques. La molécule a déjà été utilisée dans d'autres études et montré un effet sur la stimulation de la respiration. Dans la procédure 2, la séparation maternelle pour la mesure respiratoire est d'une heure. Les souriceaux sont tous euthanasiés après les 12 heures d'observation.

Les deux procédures nécessitent alors 320 animaux.

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

- Remplacement : L'étude préclinique sur des animaux en développement est un préalable recommandé par l'Agence européenne du médicament pour les stratégies thérapeutiques pharmacologiques notamment pédiatriques, l'utilisation de l'animal ne peut être évitée.
- Réduction : Les effectifs sont calculés pour mettre en évidence une différence biologique significative.
- Raffinement : Nous utilisons des techniques de mesures non invasives à température constante pour respecter la physiologie de l'animal. Pour la procédure 2, l'enregistrement en simultané de plusieurs paramètres réduit les manipulations sur l'animal. Les animaux sont surveillés toutes les heures sur les 12h d'observation avec des critères définis pour éviter toute souffrance. A l'issue des 12heures, tous les souriceaux sont euthanasiés. Les cages des femelles sont enrichies en papier doux absorbant pour la construction du nid. La séparation maternelle n'excède pas une heure et la femelle est toujours avec des petits afin d'entretenir la lactation.

Nos expériences ne sont pas douloureuses et ne doivent entraîner de souffrances aux animaux. Toutefois nous avons établi des critères points limites adaptés à l'âge des souriceaux nous permettant d'identifier et de limiter la souffrance. La mise à mort en fin d'expérience ou dans le cas de points limites atteints sera effectuée selon les méthodes réglementaires.

**19910** Le but de ce projet est d'étudier les changements d'activité d'un réseau de structures cérébrales après un stress. En particulier, nous étudierons les altérations plastiques dans une structure cérébrale particulière, le cortex insulaire (ou insula) et son réseau associé qui pourrait jouer un rôle dans le dysfonctionnement des comportements liés à l'émotion.

Il est en effet connu que des dysfonctionnements émotionnels sont étroitement liés à la vulnérabilité à l'addiction, et qu'ils peuvent être également induits par la prise chronique de drogues. Par exemple, l'anxiété ou la dépression pourrait augmenter le risque de développer une consommation de drogues mais également augmenter le risque de rechute après une prise chronique de drogues. Il est important de noter que, compte tenu de son rôle dans l'intégration des informations internes

du corps (comme les changements de rythme cardiaque) et ses connexions anatomiques denses avec d'autres régions cérébrales, le cortex insulaire pourrait servir de centre modulateur du comportement émotionnel. Notre hypothèse de travail est qu'une dérégulation de l'information entre le cortex insulaire et deux autres structures cérébrales (noyau accumbens et amygdale basolatérale) est associée à la propension à développer une anxiété et/ou une dépression, ce qui pourrait finalement entraîner des risques accrus de rechute. Ce projet vise à utiliser le stress afin de classifier des comportements spécifiques (induits par le stress) afin de mettre en évidence des marqueurs biologiques dans le circuit du cortex insulaire, qui pourraient être liés à l'augmentation du risque de rechute à l'addiction.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'un processus psychobiologique, peut-être uniquement mené sur un animal vivant. En effet, Nous étudions les bases comportementales et neurobiologiques impliquées dans les émotions et les troubles associés à l'exposition à un stress. L'étude de ce processus nécessite la présence de réseaux neuronaux intacts et fonctionnels qui sont uniquement accessibles dans des modèles d'animaux intègres et donc vivants. Il n'est donc pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier (remplacer). Nous avons calculé que pour cette étude 684 rats maximum seront nécessaires pour obtenir des données qui seront analysables statistiquement. Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles et en ayant recours à des analyses statistiques de type ANOVA et un calcul de puissance qui permet de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement significatifs (réduire). Pour améliorer leur bien-être, les animaux seront hébergés avec des objets d'enrichissements (exemple : objets en bois, tunnels). L'état des animaux sera régulièrement évalué selon une grille de suivi de bien-être animal pendant toute la durée des procédures. Le bien-être animal a été pris en compte pour chaque procédure et une prise en charge de l'animal a été définie en fonction de chaque procédure. Pour les animaux subissant une chirurgie, la température sera contrôlée et maintenue grâce à un tapis chauffant et une prise en charge de la douleur sera mise en place (raffiner). Ce projet permettra d'appréhender une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents à l'exposition à un stress répété et pourra avoir un impact sur la prise en charge des maladies psychiatriques chez l'Homme.

**19911** Le cervelet est structuré cérébrale dont les fonctions ont longtemps été associées au strict contrôle du mouvement. Les troubles du cervelet, qu'ils soient provoqués par des malformations, des lésions ou des phénomènes de neurodégénérescence, sont en effet souvent marqués par des symptômes moteurs caractéristiques et notamment l'incapacité à réaliser des mouvements précis et coordonnés. Au cours des vingt dernières années, des travaux menés chez l'homme et chez l'animal ont considérablement élargi notre compréhension des fonctions cérébelleuses, révélant un spectre d'actions allant du contrôle de l'apprentissage et de l'exécution des mouvements jusqu'à des fonctions cognitives comme la planification et l'orientation spatiale, en passant par le contrôle des réponses émotionnelles. Ces fonctions reposent sur un dialogue du cervelet avec un ensemble de structures du cerveau antérieur via des voies anatomiques encore insuffisamment étudiées et caractérisées. Ce dialogue du cervelet avec le reste du cerveau apparaît perturbé dans certaines pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou la dyslexie, des affections neurologiques telles la maladie de Parkinson, les dyskinésies et les dystonies, ou des troubles psychiatriques tels que les troubles anxieux.

Notre travail de recherche s'inscrit dans une démarche visant à mieux comprendre les interactions du cervelet avec le cerveau antérieur : sur quelles voies anatomiques reposent-elles ? quelles fonctions assurent-elles ? quelle est la nature des échanges entre cervelet et cerveau antérieur ? Nos recherches portent sur six axes principaux : 1) le dialogue cérébello-cortical dans le système des vibrisses, sortes de « moustaches » que les rongeurs utilisent pour sonder leur environnement, dont les principes fondamentaux pourraient nous éclairer sur le rôle du cervelet dans l'acquisition d'informations tactiles, 2) les interactions du cervelet avec le système moteur (cortex moteur et ganglions de la base) dans le contexte de l'apprentissage d'habiletés motrices mais également 3)

dans des situations pathologiques telles que la maladie de Parkinson, les dyskinésies et les dystonies, 4) le rôle du cervelet dans l'émergence d'un sens de l'orientation spatiale à partir des informations de mouvement issus de l'oreille interne, 5) l'influence du cervelet dans le traitement de la douleur, et enfin 6) son rôle dans la régulation du conditionnement et de l'extinction de la peur.

Ce projet est basé sur l'utilisation de rongeurs (total :1480 souris et 361 rats sur 5 ans, soit 296 souris et 72 rats par an) ; ces modèles animaux classiques permettent de réaliser des analyses physio-anatomiques poussées (notamment à l'échelle cellulaire) tout en restant pertinent du point de vue de la neurophysiologie humaine (la grande majorité des structures cérébrales de ces animaux ont un équivalent chez l'homme). Les connaissances accumulées sur la neurophysiologie de ces animaux sont également un atout pour mettre au points des expériences ayant les plus grandes chances de donner des résultats probants. Les outils technologiques développés autour de ces animaux, en particulier dans le domaine du génie génétique, nous offrent également un contexte optimal pour réaliser des expériences à fort rendement scientifique tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Les approches que nous utiliserons comprennent des mesures électrophysiologiques et optiques de l'activité neuronale, des perturbations optogénétiques et chémogénétiques de populations neuronales ciblées, des traçages neuro-anatomiques ainsi que des mesures comportementales.

Toutes nos procédures sont conçues de manière à satisfaire au mieux aux recommandations de la règle dites « des 3R » (remplacer, réduire, raffiner).

**REMPLETER.** Notre travail prend en compte le rapport entre le coût effectif d'une expérience et le bénéfice scientifique qui pourrait en résulter. Certaines expériences pourtant techniquement possibles peuvent s'avérer peu avantageuses au regard de leur difficulté technique et du nombre d'animaux requis rapportés à aux résultats escomptés. Notre équipe a les ressources, en interne ou via des collaborations externes, pour remplacer dans certains cas ce type d'expérience par des travaux de modélisation in silico.

**RÉDUIRE.** Les effectifs d'animaux sont calibrés de manière à obtenir des résultats solides et statistiquement valables, sans pour autant être disproportionnés. Ils sont également adaptables au cours du projet (l'expérimentation sur un lot d'animaux peut être stoppée si un résultat très clair se dégage avant d'avoir utilisé tous les animaux du lot). Un même lot d'animaux peut être utilisé dans plusieurs protocoles différents à condition que cette option soit scientifiquement valide et ne génère pas de désagréments supplémentaires pour les animaux. Les approches et outils sélectionnés en priorité sont ceux susceptibles de maximiser l'information obtenue pour chaque animal (par exemple systèmes de multiélectrodes plutôt que d'électrodes simples). Cette logique prévaut également pour les outils d'analyse de données.

**RAFFINER.** Les conditions de réalisation des expériences sont étudiées pour réduire au maximum l'inconfort des animaux (utilisation de conditions d'anesthésie et d'analgésies optimales, protocoles d'habituation progressifs visant à réduire le stress). L'état des animaux est vérifié quotidiennement par des agents formés à reconnaître les signes de douleur ou de stress et leurs observations sont consignées. Tous les animaux bénéficient d'un espace de stabulation enrichi visant à satisfaire leurs besoins naturels (espaces dissimulés dans lesquels ils peuvent loger, matériaux pour la construction de nid ainsi que pour le rongage et le jeu). Ils sont le plus systématiquement possible regroupés de manière à bénéficier de contacts sociaux avec leurs congénères, comme c'est le cas dans les colonies qu'ils forment à l'état sauvage. Enfin les agents qui réalisent les expériences bénéficient tous d'une formation réglementaire à l'expérimentation animale ; les nouveaux membres sont formés et encadrés par des membres expérimentés de l'équipe.

## **19912** Objectif du projet :

L'accident vasculaire cérébral (AVC) d'origine ischémique constitue la deuxième cause de mortalité dans le monde, la troisième cause de mortalité prématurée et la première cause de handicap chez l'adulte au sein des pays dit développés. Cette pathologie neurologique est caractérisée par la survenue d'un infarctus cérébral secondaire à l'interruption brutale du flux sanguin artériel par une thrombose fibrino-cruorique dans une région cérébrale spécifique. Cet événement ischémique induit

une mort neuronale dont le processus est multiphasique impliquant excitotoxicité, apoptose et inflammation. Ce dernier processus résulte de l'activation locale exacerbée de la microglie (cellules immunitaires résidentes du cerveau) mais aussi de l'ensemble des acteurs immuns innés et acquis d'origine systémique. Cet événement neuro-vasculaire grave, restant très largement sans stratégie thérapeutique significative, est une problématique majeure de santé publique. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aigüe de l'infarctus cérébral se résume par des mesures symptomatiques (contrôle de la tension artérielle, réduction de l'œdème cérébral, contrôle de la température, régulation de la glycémie), l'utilisation d'antiagrégants plaquettaires et d'agents fibrinolytiques. Les seules thérapeutiques spécifiques approuvées et recommandées se résument par la thrombolyse (l'injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA)) associée ou non à la thrombectomie (élimination mécanique de la thrombose). Néanmoins, seule une faible proportion des patients (<10%) ont accès à ces deux prises en charge thérapeutique spécifiques, du fait des difficultés d'accès aux centres hospitaliers ayant les compétences pour la réalisation de la thrombectomie, mais aussi, des effets secondaires des agents fibrinolytiques tel que le tPA.

En ce sens, il est indispensable de poursuivre la recherche translationnelle afin de développer de nouvelles stratégies innovantes visant à traiter efficacement cette pathologie.

L'objectif de cette étude vise à préciser le rôle physiopathologique de nouveaux acteurs cellulaires impliqués dans les mécanismes de neuro-inflammation survenant au décours de l'infarctus cérébral, notamment le rôle des mastocytes, cellules de l'immunité innée libérant après activation le contenu de leurs granules métachromatiques, extrêmement riches en cytokines et chemokynes ayant une action pro-inflammatoire. En précisant l'implication des mastocytes dans ce syndrome inflammatoire post-ischémie cérébrale, il fait sens d'envisager l'utilisation de traitements ciblés afin de prévenir la mort neuronale induite par la réponse inflammatoire.

Le projet fera l'objet de trois phases distinctes. La première sera une étude de l'impact de la modulation de l'activité mastocytaire à la phase initiale de l'ischémie cérébrale (+20 min de la chirurgie), dans un modèle d'ischémie transitoire (le modèle thromboembolique dont le principe repose sur l'injection d'un agent pro-coagulant (la thrombine) directement dans la lumière d'une artère cérébrale moyenne).

La deuxième phase sera une étude de l'impact de la modulation de l'activité mastocytaire à la phase initiale de l'ischémie cérébrale (+20 min de la chirurgie) au décours d'une fibrinolyse par tPA (réalisée 20 minutes après la chirurgie), dans le même modèle d'ischémie transitoire. Afin de démontrer si l'immunomodulation des voies d'action mastocytaire (stabilisation / inhibition) permettrait d'élargir la fenêtre thérapeutique du tPA, en évitant les effets secondaires indésirables. La troisième phase sera une étude de l'impact de la modulation de l'activité mastocytaire à la phase initiale de l'ischémie cérébrale (+20 min de la chirurgie), dans le même modèle d'ischémie transitoire, en situation de comorbidité cardio-vasculaire (diabète). Afin de démontrer si l'immunomodulation des voies d'action mastocytaire (stabilisation / inhibition) permettrait de diminuer le risque de transformation hémorragique en situation de comorbidité diabétique.

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.

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants car des techniques de remplacement ne sont pas susceptibles d'apporter le même niveau d'information. 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 la littérature.

297 souris seront nécessaires pour réaliser les 3 étapes (270 + 27 considérant un échec possible de 10% dans les chirurgies), 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 (points limites précoces et critères d'arrêt (Cf. rubrique 3.4.13)). 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.

**19913** Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Les principales approches de traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récurrence du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire antitumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur.

La vaccination peptidique est l'une des premières approches d'immunothérapie spécifique. C'est un processus actif où une population de lymphocytes T CD8+ spécifiques est stimulée par l'injection dans le tissu en sous-cutané de peptides et d'un adjuvant. L'un des aspects importants de la vaccination est de permettre une stimulation du système immunitaire à distance de la tumeur qui devient capable d'éliminer les cellules tumorales exprimant les antigènes délivrés par la vaccination peptidique.

D'autres stratégies cherchent à améliorer l'action des cellules T effectrices ainsi qu'à inhiber la fonction des cellules régulatrices. La voie PD-1/PD-L1 a un rôle majeur dans l'inhibition de la réponse des lymphocytes T. Des anticorps ciblant cette voie PD1/PD-L1 (Nivolumab, Pembrolizumab, Avelumab) ont été générés pour réactiver la réponse T antitumorale et ont démontré des effets bénéfiques considérables dans le traitement de divers cancers. Ces essais cliniques ont été rendus possibles grâce à la preuve de concept sur des modèles précliniques murins. Aujourd'hui, ces anticorps anti-PD-1/PD-L1 sont approuvés comme agents thérapeutiques de première ligne pour certains cancers du poumon et de la peau. Cependant il est estimé que seulement une partie des patients (15-60% selon le cancer) répondent à la thérapie et que plusieurs rechutes sont observées après traitement. Il est donc essentiel de chercher d'autres molécules et combinaisons thérapeutiques.

Des études cliniques (actuellement phase 3, ou devenu traitement de référence) ont déjà été réalisées chez l'Homme pour ces deux produits d'immunothérapie et ont fait leur preuve par exemple dans le cancer du poumon. Leur efficacité amène les professionnels de santé à modifier l'ordre des lignes de traitements des patients atteints de ces pathologies. A ce stade la question de la combinaison thérapeutique (temps, séquence) des produits d'immunothérapie se pose pour optimiser la réponse antitumorale des patients. Les données précliniques chez la souris sont indispensables à cette étape car ils permettent de tester *in vivo* l'efficacité des différentes combinaisons de traitements. De plus, chaque modèle utilisé dans ce projet repose sur des modèles

précliniques dont la pathologie est reconnue par la communauté scientifique comme proche de celle de l'homme.

Dans cette étude, nous souhaitons évaluer l'efficacité de la combinaison thérapeutique d'un vaccin tumoral (peptides) et d'un anticorps ciblant le récepteur inhibiteur PD-1 dans différents modèles de cancer chez la souris. La séquence et les planifications de traitement constituent un point clé de notre étude, afin d'optimiser l'effet thérapeutique des futurs essais cliniques.

Le nombre d'animaux utilisés sera de 1944 souris au maximum (réparties sur 4 modèles de cancers différents, en 3 étapes sur 3 souches de souris) pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique et une relevance scientifique.

Le projet a été pensé pour répondre à des besoins scientifiques tout en adoptant un comportement responsable en matière d'expérimentation animale (Règle des 3R). Ces traitements à évaluer dans différents modèles tumoraux ont déjà démontrés des résultats prometteurs *in vitro* et également chez l'homme. Le nombre d'animaux est réduit par une mutualisation des groupes contrôles lorsque c'est possible, et il est limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Pour le bien-être des animaux, une étape d'acclimatation de 5 jours minimum sera respectée avant inclusion dans des protocoles expérimentaux. 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 par cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Enfin des points limites ont été mis en place afin de réagir rapidement en cas d'inefficacité des traitements ou de souffrances animales.

**19914** La myopathie que nous étudions est une maladie musculaire génétique. Elle est caractérisée par une faiblesse des muscles du tronc et du cou, conduisant au développement d'une scoliose et d'une insuffisance respiratoire sévères. Ces altérations musculaires apparaissent dès l'enfance et s'aggravent avec l'âge, entraînant une morbidité précoce. Par ailleurs nombreux patients présentent aussi un diabète associé à un poids faible dû à la perte musculaire, et à une augmentation des tissus adipeux. Enfin, les patients souffrent d'un vieillissement prématuré avec une détérioration rapide de leurs capacités physiques.

Les mutations responsables de cette myopathie ont donc des effets multiples et néfastes qui ont des conséquences délétères chez les patients, en particulier sur l'activité musculaire et sur le métabolisme énergétique, c'est à dire sur la dépense et le stockage d'énergie dans l'organisme.

Nous voulons comprendre les mécanismes responsables de ces dysfonctions musculaires et métaboliques pour mettre au point des outils permettant de caractériser la pathologie et trouver des traitements adaptés, car à ce jour, aucun traitement efficace n'existe.

Grâce à nos modèles de cellules inactivées pour le gène d'intérêt et aux cellules issues de biopsies de patients, nous venons d'identifier des mécanismes pathologiques et dix molécules thérapeutiques candidats, utilisées en médecine. Mais l'étude des fonctions du muscle et du métabolisme, ainsi que la validation de l'efficacité d'un traitement nécessitent une analyse *in vivo* et donc l'utilisation de modèles animaux. Les tests cellulaires nous ont permis de sélectionner et de réduire le nombre de molécules à tester sur les animaux et par conséquent de limiter leur utilisation au strict minimum (remplacement/réduction). Nous disposons d'un modèle de souris transgéniques qui reproduit les différentes altérations décrites chez les patients atteints de cette myopathie.

Nous proposons de développer nos recherches selon les axes exposés ci-dessous et suivant les principes des 3R, en utilisant des cellules musculaires en culture tant que les expériences le permettent et le modèle de souris transgéniques pour les expériences nécessairement *in vivo*. Nous avons choisi une chronologie de procédures qui permet d'utiliser les animaux dans plusieurs procédures tout en respectant leur bien-être, et donc de minimiser le nombre d'animaux pour ce projet. Pour minimiser les dommages aux animaux, ils bénéficieront d'un environnement enrichi (outil de nidification) et du maintien de l'interaction sociale en étant groupés, et resteront sous

surveillance tout au long du projet. Pour chaque procédure, des points limites ont été fixés et des méthodes prévues (anesthésie, analgésie) pour éviter toute souffrance ou douleur aux animaux, qui resteront sous surveillance tout au long du projet. Nous comptabilisons un total de 640 animaux pour le projet (sur les 4 établissements utilisateurs), décrit ci-dessous :

1) Compréhension des mécanismes qui conduisent des mutations à la myopathie:

- Caractérisation moléculaire des mécanismes responsables de la myopathie et recherche de marqueurs permettant d'établir le diagnostic et de suivre les effets des traitements, tout d'abord dans des cellules musculaires en culture, puis validation dans les muscles (Remplacement-Réduction-Raffinement).

2) Conséquences de la fonction mutée sur le métabolisme énergétique et sur la fonction musculaire, effets des traitements:

- L'évaluation de l'état métabolique global et musculaire des animaux traités/non traités nécessite une étude *in vivo* (sans alternative) par méthodes non invasives et par prélèvements sanguins : mesure de composition corporelle (masse grasse/masse maigre), bilan énergétique, profil glycémique et insulémique.

- L'évaluation de la fonction musculaire des animaux traités/non traités nécessite d'être réalisées sur l'animal (sans alternative): tests d'effort sur tapis roulant, mesure de la force et de la résistance à la fatigue musculaire.

**19915** Le poisson zèbre est très utilisé comme modèle de remplacement en expérimentation animale, en particulier aux stades embryonnaires et des pré-cribles peuvent être réalisés avec cette espèce de petite taille facile à élever afin de limiter par la suite au maximum l'utilisation de mammifères dans les études portant sur la régénération, c'est-à-dire la capacité d'un organisme à réparer un tissu abîmé, avec d'importantes applications en médecine régénérative humaine. Au contraire des mammifères, il présente en effet un potentiel exceptionnel de régénération suite à des lésions sur le cœur ou le cerveau. Il a été démontré que le cerveau antérieur, la moelle épinière ou la rétine du poisson zèbre régénèrent suite à une lésion mécanique. La compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ces capacités pourrait ouvrir de nombreuses perspectives pour le traitement de maladies ou traumatismes qui touchent le cerveau humain. Un des points clés est d'identifier les cellules à l'origine de la génération des nouveaux neurones.

Notre projet vise à décrire quelles cellules sont activées par une lésion du cerveau et permettent de contribuer à refermer la blessure chez le poisson zèbre. Dans ce but, nous étudierons une région du cerveau qui se nomme le toit optique. Le toit optique présente en effet plusieurs avantages :

Cette région du cerveau traite les informations visuelles et est située en position dorsale, elle est donc facile d'accès pour faire une lésion qui n'aura que peu de conséquences sur le comportement du poisson;

Il est formé de deux lobes symétriques. Nous n'effectuerons la lésion que dans un lobe, l'autre nous servant de contrôle pour nos analyses.

Nous effectuerons deux procédures avec des étapes optionnelles qui utiliseront 600 poissons au total:

Une unique blessure sera appliquée au cerveau du poisson :

- soit au moyen d'une fine aiguille insérée à travers le crâne sur des poissons préalablement anesthésiés (procédure 1). Cette procédure a l'intérêt de simuler un traumatisme crânien.

- soit au moyen d'un laser multiphoton sur des poissons préalablement anesthésiés et en présence de l'anesthésiant (procédure 2). Cette procédure a l'intérêt de simuler un accident vasculaire cérébral de type ischémique.

Les lésions du système nerveux n'induisent pas de douleurs car le cerveau ne contient pas ce type de cellules sensorielles et la blessure superficielle de la peau et du crâne correspond à une piqûre d'aiguille (douleur modérée).

Ensuite, nous appliquerons à une minorité de poissons une étape supplémentaire de balnéation d'un marqueur de la prolifération cellulaire, afin de décrire la dynamique de prolifération des cellules. Dans une autre étape optionnelle, nous appliquerons un traitement avec un peptide ou son antagoniste chimique.

Dans ces procédures, les poissons sont alors euthanasiés après différents temps suivant la blessure pour caractériser la réparation du cerveau sur échantillon.

Nous avons mis en place des mesures pour répondre à certaines des exigences de la règle des 3R:

Raffinement: contrôle de l'anesthésie et de l'oxygénation lors du réveil permettant de limiter le stress et d'obtenir une mortalité nulle.

Réduction : notre méthode de lésion sur une structure symétrique du cerveau permet que l'animal traité serve lui-même de contrôle. Nous divisons ainsi par deux le nombre d'animaux que nous aurions dû utiliser si nos animaux contrôles étaient des animaux non soumis à la lésion.

Nous allons réaliser l'acquisition d'images 3D qui permettent d'obtenir des résultats avec peu de spécimens. De plus, nous limitons le nombre d'animaux au strict minimum grâce à des analyses statistiques sophistiquées sur les images 3D.

Au total, 600 poissons seront utilisés.

**19916** Notre projet propose d'étudier les effets de la relaxine 3 dans le contrôle de la transmission sensorielle normale et pathologique. La relaxine-3 est un peptide de la famille de l'insuline, exprimé uniquement dans le système nerveux central. Elle est libérée dans plusieurs aires cérébrales où elle influence un grand nombre de fonctions comme la prise de nourriture, l'addiction à l'alcool, le sommeil, le stress... L'interaction avec son récepteur RXFP3, contribue à limiter le stress induit par des conditions pathologiques ce qui en fait une molécule potentiellement efficace contre la douleur fréquemment associée à des situations de stress. Nous avons montré lors d'expériences préliminaires que la relaxine-3 injectée dans le cerveau avait des effets analgésiques (qui diminuent la perception sensorielle) significatifs en cas de douleurs inflammatoires. Nous allons maintenant nous attacher à préciser les aires cérébrales et les voies nerveuses qui sont affectées par la relaxine-3.

Nous travaillerons d'abord sur des animaux contrôles puis sur des modèles inflammatoires chez la souris. Nous mettrons en œuvre des expériences d'identification des voies nerveuses sur des souris transgéniques permettant de visualiser spécifiquement les neurones à relaxine-3 ou les neurones à somatostatine exprimant le récepteur RXFP3.

Nous étudierons alors les modifications des voies nerveuses régulées par la relaxine-3. A l'aide d'enregistrements électrophysiologiques, nous chercherons si l'injection intra-cérébrale de relaxine-3 produit un effet analgésique au niveau de la moelle épinière. Nous décrirons les voies nerveuses régulées par la relaxine-3 en les observant en microscopie après coloration.

Ce projet respecte la règle des 3R. Pour le R de Raffiner, tous les protocoles sont optimisés pour soulager le stress et la douleur des animaux. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie gazeuse comme indiqué lors des procédures et un anti-douleur sera administré quand c'est nécessaire avant et après chirurgie pour éviter les douleurs post-chirurgicales. Les animaux seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur avec une surveillance renforcée après la chirurgie jusqu'à la fin de l'expérimentation avec la mise en place d'une réhydratation, un réchauffement et des traitements vétérinaires si besoin. Un enrichissement de leur milieu est prévu en installant des maisons en papier mâché que les animaux peuvent utiliser pour se cacher ou ronger. Leur bien-être sera contrôlé par la cellule de bien-être de l'animalerie. Des points limites sont définis pour éviter la souffrance des animaux.

Pour le R de Remplacer, le recours au modèle animal est indispensable car ce projet demande une évaluation comportementale sur animal entier et aucun modèle *in vitro* ne peut répondre à cette étude.

La réduction du nombre d'animaux (R de réduire) est prise en compte tout en conservant une signification scientifique statistique qui tient compte de l'hétérogénéité inter-individuelle et des différences liées au sexe. Le nombre de souris utilisé dans chacun des groupes expérimentaux sera ainsi de 12 animaux par groupe. La réalisation de ce projet nécessite au total l'utilisation de 1512 souris transgéniques, soit relaxine-cre (720 souris) soit somatostatine-cre (720 souris) ou somatostatine-flp (72 souris).

**19917** L'hypophosphatémie (XLH) est une maladie dominante liée à l'X et la forme la plus courante de rachitisme héréditaire (1/20 000 naissances). La maladie XLH est caractérisée par un rachitisme accompagné de différents symptômes : déformations osseuses, petite taille, anomalies dentaires, douleurs osseuses, d'enthésopathie et de dysfonctionnement musculaire... La maladie est associée à une mutation du gène PHEX entraînant une production excessive de facteur de croissance des fibroblastes 23 (FGF23) par les ostéocytes. Le FGF23 est un régulateur clé du métabolisme du phosphate et de la vitamine D. Un excès de FGF23 entraîne une déperdition rénale de phosphate et une réduction de la production de vitamine D active. Les patients atteints de XLH présentent une hypophosphatémie avec de faibles niveaux de réabsorption rénale du phosphate, des taux de calcium sérique normaux, des activités de la phosphatase alcaline sérique élevées, des taux d'hormones parathyroïdiennes normaux ou accrus, des taux de vitamine D active normaux ou accrus et des taux de FGF23 élevés.

L'XLH diffère des autres formes de rachitisme car résistant à la vitamine D. Les traitements de substitution conventionnels consistant à l'administration orale de phosphate associée à de fortes doses de calcitriol, sont généralement nécessaires bien que leurs effets sur la croissance restent insuffisants.

Récemment, le Burosumab (Crysvita), un anticorps monoclonal spécifique du FGF23, a été approuvé comme médicament orphelin pour le traitement de l'XLH. Cependant, la nécessité de répéter l'injection toutes les deux semaines reste le principal inconvénient.

Nous avons développé un vecteur de type Adénovirus Associé, l'AAV8-anti-FGF23 dont l'efficacité, en tant que traitement de thérapie génique pour la maladie XLH, a été étudiée chez le rongeur. Les résultats obtenus sur la souris Hypduk, modèle de la maladie de XLH, sont encourageants puisqu'ils montrent que l'injection d'AAV8-anti-FGF23 entraîne une augmentation du phosphate sérique ainsi qu'une amélioration de la minéralisation osseuse, ce qui conduit à la correction d'autres symptômes, tels que l'accroissement de la taille du corps et de la longueur de la queue.

Cette étude chez le lapin, permettra d'évaluer l'effet du vecteur AAV8-anti-FGF23 sur différents paramètres biochimiques sanguins et des urinaires, dont le suivi du taux de phosphate. Ces résultats seront comparés à ceux obtenus avec le traitement au Burosumab dont l'effet sur l'augmentation du phosphate est transitoire.

D'autre part, les humains sont des hôtes naturels d'AAVs, et sont donc porteurs d'anticorps neutralisants anti-AAV, limitant le transfert de gène, problème majeur de la thérapie génique. Une étude précédente réalisée chez le macaque a démontré l'intérêt d'une administration d'IdeS, endopeptidase dégradant les IgG (immunoglobulines G) circulantes et donc les IgGs anti-AAV8, avant l'injection d'AAV, afin de s'affranchir des anticorps pré-existants. Mais cette activité d'IdeS est limitée sur les IgG de macaque, alors que la dégradation est totale sur les IgGs humain et de lapin. Aussi, le lapin semble être le modèle idéal pour étudier l'efficacité d'un traitement IdeS sur les anticorps anti-AAV et particulièrement dans le cas où ce titre en anticorps neutralisants serait élevé. Aussi nous testerons IdeS chez 2 des lapins de l'étude ayant reçu du vecteur AAV.

Ce projet comporte 2 phases, Cf. Annexe 1 :

#### Etude Pilote

Chez un même animal, comparaison des traitements ; 1) immunothérapie (administration de Burosumab) ; 2) thérapie génique (administration d'AAV) sur l'augmentation du phosphate sérique et urinaire au cours du temps.

Puis traitement à l'aide d'IdeS

Groupe 1 : 2 animaux suivis 84 jours avant sacrifice

Etude complémentaire

Si les résultats de l'étude Pilote ne sont pas satisfaisants, les doses d'AAV et de Burosumab seront modifiées afin d'obtenir un effet suffisant sur la concentration en phosphate sérique. Dans cette étude complémentaire l'évaluation sera réalisée sur 2 groupes d'animaux.

Groupe 2 : 3 animaux suivis pendant 28 jours après injection de Burosumab.

Groupe 3 : 3 animaux suivis pendant 56 jours après injection d'AAV et avant sacrifice.

Des prélèvements sanguins et recueils d'urines seront effectués tout au long du suivi des 3 groupes pour analyses biochimiques, dosage du calcitriol, expression du transgène et évaluation immunologique

Selon les groupes, les prélèvements post-mortem permettront d'évaluer la biodistribution du vecteur et l'histopathologie.

A noter que les animaux du groupe 2 ne seront pas sacrifiés et seront intégrés dans un programme de réhabilitation.

Réduction :

Un total de 10 lapins mâles au maximum sera inclus dans ce projet : 8 lapins plus 2 lapins supplémentaires en cas d'exclusion d'un animal pour des raisons éthiques

- groupe 1 : 2 lapins
- groupe 2 : 3 lapins
- groupe 3 : 3 lapins

Le fort taux d'anticorps neutralisant anti-AAV8 des 2 animaux du groupe 1 après injection d'AAV, sera l'occasion d'évaluer l'activité d'IdeS chez cette espèce et de vérifier son efficacité sur les IgG anti-AAV8 circulantes sans avoir à inclure d'animaux supplémentaires.

Si les résultats de l'étude Pilote sont satisfaisants (augmentation du taux de phosphate stable dans le temps), l'étude complémentaire ne sera pas réalisée, minimisant ainsi le nombre d'animaux inclus.

Ce projet est une étude comparative de 2 traitements (TG v/s anticorps monoclonal) qui ne nécessitera pas obligatoirement d'analyses statistiques. Néanmoins, une exploitation statistique serait plus intéressante, et dépendra des résultats obtenus pour chaque groupe. Si ceux-ci montrent un effet clair du traitement AAV sur le taux de phosphate sérique, nous pourrions envisager d'utiliser un RM one way ANOVA (mesures répétées), ou un two way ANOVA, Sidak's multiple comparisons test.

L'évaluation de l'efficacité d'IdeS sur les IgG de lapin sera réalisée par dosage du taux d'IgG anti-AAV8 et des anticorps neutralisants anti-AAV8 avant et après traitement. La digestion des immunoglobulines sera évaluée par Western blot.

Raffinement :

- Hébergement avec enrichissement du milieu : hébergement en groupe selon la compatibilité des animaux, box sur sol avec zones surélevées ; boîtes ou tunnels, mise à disposition d'objets d'enrichissement (paille, foin, bâtons à mâcher...)
- un suivi observationnel et clinique régulier des animaux
- quand nécessaire, les interventions sont réalisées sous anesthésie et analgésie (prélèvements sanguins ante-mortem).
- traitement analgésique local sera mis en place.
- un suivi post-chirurgie par un vétérinaire ou 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, cf. annexe 2.

Remplacement :

Les patients atteints de XLH présentant une hypophosphatémie avec de faibles niveaux de réabsorption rénale du phosphate, l'expérimentation animale proposée ici vise à obtenir une augmentation du taux de phosphate sérique. Les processus biologiques intervenant ne peuvent pas être simulés par des modèles *in vitro*, aussi un organisme intact est requis pour sa mise en œuvre.

**19918** Le cortex surrénal est un organe endocrine qui sécrète des hormones stéroïdes. Celles-ci régulent des fonctions biologiques importantes telles que la pression artérielle, le métabolisme du glucose ou la réponse immunitaire. Cet organe remplit donc des fonctions essentielles à la vie. Sa persistance est assurée par le renouvellement de ces cellules. Ainsi, il a été mis en évidence chez la souris la présence de cellules souches et/ou progénitrices permettant de renouveler et maintenir le cortex surrénal. L'existence de telles cellules chez l'humain n'a pas été démontrée et leur participation à des processus physiologiques et de régénération n'est pas actuellement établie. La mise en évidence de ces cellules souches dans les surrénales humaines et leur possible participation lors de processus de régénération représente un objectif important de ce projet.

Par ailleurs, le cortex surrénal peut être affecté par le développement de tumeurs bénignes et malignes. Les formes les plus graves sont les carcinomes qui sont des tumeurs agressives et de très mauvais pronostic pour lesquelles les traitements actuels sont peu efficaces. Le mitotane est la seule molécule avec un effet thérapeutique sur cette tumeur mais son efficacité est faible et il présente de nombreux effets indésirables. Nous nous proposons de tester une nouvelle formulation du mitotane nécessitant des procédés chimiques d'encapsulation.

Pour les deux parties de notre projet, nous utiliserons la transplantation de cellules corticosurrénales normales d'origine humaine ou animale chez la souris immunodéficiente. Le site de transplantation est l'espace sous la capsule rénale. Cette procédure expérimentale peut être étendue aux cellules tumorales et permet de tester la nouvelle approche thérapeutique dans un essai préclinique. Le recours à l'animal est nécessaire car aucun modèle *in vitro* ou modèle purement murin ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité de la glande surrénale humaine, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles des cellules entre elles.

Enfin, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) lors des expérimentations *in vivo*. Nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. Dans la globalité des différents aspects de ce projet, nous ne pouvons pas remplacer les animaux, mais nous avons tout mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux (5 à 10 par groupe selon les procédures). Par ailleurs, la reproductibilité du geste chirurgical de la transplantation représente une assurance permettant de réduire le nombre d'animaux. De plus les animaux recevront en post-opératoire des traitements médicamenteux afin de réduire la douleur et les risques d'infection inhérents à ce type de procédure (Raffiner). Les animaux issus de la même portée sont placés dans leur cage d'origine dans un milieu enrichi (rouleau de cellulose et tunnel de polycarbonate rouge déposés dans les cages). Le bien-être des animaux fait l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées et mises à mort dès lors qu'un des points limites sera atteint (perte de poids sur plusieurs jours et atteignant au final 20% du poids initial, présence de tumeurs incompatibles avec la vie sans inconfort) au cours des expériences. Au total entre 198 et 248 animaux seront utilisés pour ces travaux prévus sur cinq ans.

**19919** Les néoplasies myéloïdes représentent des cancers fréquents dont les mécanismes d'invasion du sang et de la moelle osseuse 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 de temps 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 aussi 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 myéloïdes 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, dans la première partie du projet nous allons utiliser des lignées de souris transgéniques qui, après croisement, permettent d'obtenir deux modèles de souris reproduisant les premières étapes des néoplasies myéloïdes 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 souffrance qui conduiront à leur euthanasie.

La deuxième partie du projet consistera à faire des greffes de cellules 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 néoplasies myéloïdes. Nous purifierons les cellules hématopoïétiques à partir de la moelle osseuse de souris transgéniques (obtenue après l'euthanasie de ces animaux). Puis nous les injecterons par voie intra-veineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue sur souris éveillée) à des souris normales, dont les cellules hématopoïétiques normales auront été éliminées au préalable (injection d'un produit détruisant spécifiquement ces cellules ou par irradiation). Ce modèle permettra de reproduire les hémopathies humaines : les syndromes myélodysplasiques (SMD) qui représentent une étape pré-leucémique et la leucémie myéloïde aiguë (LAM). Nous suivrons le développement de la maladie en réalisant des prélèvements de sang une fois toutes les 3 semaines (prélèvement au niveau de la joue sur souris éveillée). Ce modèle préclinique sera utilisé pour étudier l'efficacité de 3 médicaments. Ils seront administrés soit par gavage à l'aide d'une sonde souple ou par injection intra-péritonéale (toutes les voies d'administration sont non douloureuses et réalisées sur souris éveillées et ne nécessitent pas d'administration d'anti-douleur). Le suivi du développement des cellules tumorales pourra être suivi par imagerie (acquisition des images sur souris anesthésiées pour une durée de 15 minutes).

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (remplacer, réduire et raffiner).

**REPLACER.** Pour mener à bien notre projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable ; seul un animal vivant peut permettre d'étudier l'effet des traitements sur la réponse anti-tumorale. Cependant, dans les études que nous menons, des techniques alternatives (culture cellulaire) sont largement employées et remplaceront l'utilisation d'un modèle animal dans la mesure du possible et autant que possible.

**REDUIRE.** Pour réduire le nombre d'animaux nécessaires, le fond génétique des souris est contrôlé et homogène. Les souris contrôles proviennent du même croisement que les souris expérimentales. Afin de réduire le nombre d'animaux contrôles pour chaque médicament testé, les expériences seront menées dans la mesure du possible en parallèle sur plusieurs médicaments afin d'utiliser un seul groupe de souris contrôles pour les différents médicaments. Les protocoles expérimentaux seront le plus possible reproduits à l'identique afin de limiter les mises au point technologiques et de pouvoir utiliser les différents groupes de souris comme contrôles d'expériences différentes.

**RAFFINER.** Nous avons amélioré au mieux les conditions d'élevage et d'hébergement (enrichissement). Les procédures sont soigneusement planifiées pour éviter le stress, et les critères d'arrêt anticipé (points limites) sont bien établis. La durée des études est réduite au maximum.

Au total, nous utiliserons 1080 souris sur les 3 ans que durera le projet.

Pour mieux comprendre si les mutations de certains gènes participent à une progression de la transformation tumorale, nous souhaitons introduire plusieurs gènes humains mutés ou non dans des modèles murins pour identifier leurs impacts. L'objectif principal de notre projet est l'établissement de deux modèles précliniques reproduisant les différentes étapes des néoplasies myéloïdes humaines. Pour cela nous allons utiliser plusieurs lignées de souris transgéniques (360 souris) déjà existantes qui, après croisement et sélection, permettent d'obtenir les souris (200 souris) portant les mutations souhaitées. Ces souris seront utilisées : (i) pour l'évaluation de base du bien-être de deux nouvelles lignées, (ii) pour la caractérisation de ces nouveaux modèles précliniques et



(iii) comme donneuses de cellules leucémiques. Enfin 520 souris seront utilisées pour les expériences de greffe et de test des molécules thérapeutiques. Chaque groupe expérimental sera composé de 5 souris afin d'avoir des résultats statistiquement interprétables, les expériences seront reproduites 4 fois de manière indépendante et 3 molécules ayant un potentiel thérapeutique seront testées seule ou en combinaison (5 souris/groupe ; 26 groupes/expérience soit 130 souris/expérience).

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 150 jours dans la grande majorité des cas, mais pourront aller jusqu'à 12 mois pour les souris (sans phénotype dommageable) incluses dans la procédure d'élevage. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

**19920** Optimiser les conditions d'élevage des poissons constitue un objectif important de recherche qui permettra de contribuer à répondre aux enjeux de la filière aquacole concernant les pratiques d'élevages piscicoles dans le contexte général d'une gestion durable de la pêche mondiale.

Dans ce cadre, l'objectif de ce projet est de mieux définir les mécanismes de croissance de la masse musculaire de la truite arc-en-ciel. Une accumulation efficace des protéines musculaires est essentielle à la croissance et aux qualités nutritionnelles recherchés dans la chair de poisson. Dans les cellules musculaires, cette synthèse des protéines nécessite néanmoins une très grande quantité d'énergie qui est fournie par la conversion des nutriments et la consommation d'oxygène au sein de véritables centrales énergétiques cellulaires appelées les mitochondries. Des travaux récents notamment chez la souris, indiquent que la production d'énergie par ces mitochondries doit être finement couplée à la synthèse des protéines pour éviter une perte de croissance de la masse musculaire. Ce couplage serait notamment régulé par des interactions membranaires appelées MAMs (mitochondria-associated membranes), entre mitochondries et réticulum endoplasmique (siège de la synthèse protéique).

Le but de ce travail chez la truite est d'explorer le couplage entre synthèse protéique musculaire et l'activité des mitochondries en relation avec l'étendue des MAMs et de déterminer son importance pour la croissance des poissons. Ce couplage sera donc étudié dans le muscle de truites dont la croissance aura été modulée à l'aide de 2 régimes alimentaires.

Pour ce projet, des truites (n=120) seront élevées pour une période de 6 semaines avec deux régimes alimentaires. Les élevages seront conduits en triplicat pour chaque régime (3 bassins/régime pour un total de 120 poissons). Les régimes sont constitués de manière à couvrir les besoins énergétiques des poissons (énergie digestible identique) et diffèrent de par la quantité de protéines digestibles (régime 1 - DP/DE élevé = 24,5 et un régime 2 - DP/DE bas = 13,7). L'augmentation de la quantité de protéines digestibles dans le régime provoquera une accélération de la croissance des poissons.

A l'issue de la période d'alimentation, un échantillonnage sera réalisé pour chaque régime (12 animaux/régime). Vingt minutes avant l'euthanasie, les animaux échantillonnés recevront une injection de puromycine sous anesthésie, qui permettra de marquer les protéines néosynthétisées et d'évaluer la synthèse protéique tissulaire. Après euthanasie par une surdose d'anesthésiant, la composition corporelle des poissons sera déterminée sur carcasse puis les muscles seront prélevés, utilisés extemporanément pour l'analyse de l'activité mitochondriale par oxygraphie, fixés pour l'analyse des MAMs en microscopie électronique et congelés pour l'analyse de la synthèse protéique.

Dans le contexte de forte plasticité musculaire observée chez les poissons d'élevage comme la truite, nous faisons l'hypothèse que l'intensité du couplage entre synthèse protéique et activité des mitochondries sera déterminante pour la croissance de l'animal. La comparaison de ce couplage dans deux régimes divergents devrait nous permettre à terme d'optimiser la croissance des

poissons en jouant sur l'efficacité alimentaire (selon le ratio protéines digestibles/énergie digestible du régime) ou la source de protéines (végétale ou animale).

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 une densité optimale d'animaux permettant d'éviter les comportements agressifs qui peuvent survenir avec un petit groupe de poissons (relation dominant/dominé) et d'assurer une puissance statistique suffisante dans le traitement de nos résultats. Les animaux nécessaires à l'obtention de cette densité mais non utilisés pour l'expérimentation repartiront dans un circuit classique d'élevage.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée

Les conditions d'élevage seront optimisées. Le comportement et les mortalités seront contrôlés 2 fois par jour lors de l'alimentation des animaux. Si une perte de poids anormale ou un comportement atypique étaient observés (comportement de fuite anormal pendant l'alimentation, léthargie, hyperactivité locomotrice, perte d'intégrité physique suite à un cannibalisme ou à des comportements agressifs), les animaux concernés seraient euthanasiés.

Pour l'injection, les manipulations seront réalisées le plus rapidement possible pour limiter le stress. Chaque injection est réalisée sous anesthésie générale (dans un bain de tricaine à 50mg/L). L'appréciation du stress sera évaluée sur des bases comportementales comme précisé dans le paragraphe précédent.

Enfin, tous les prélèvements seront réalisés sur animaux préalablement anesthésiés.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Le remplacement n'est possible, car cette étude concerne la régulation de mécanismes moléculaires par des régimes alimentaires spécifiques ce qui ne peut être réalisé sur cultures cellulaires ou par modélisation informatique.

**19921** Au cours des 30 dernières années, nous avons assisté à un déclin massif des populations d'oiseaux à travers l'Europe. Pour identifier les causes de cette catastrophe écologique, il est indispensable de mener des projets de recherche visant à comprendre de manière fine et intégrative comment les variations environnementales influencent les populations d'oiseaux. Le projet de recherche fondamentale qui fait l'objet de cette demande vise, avec une approche d'écologie évolutive et comportementale, à élucider les mécanismes biologiques clés permettant aux oiseaux de s'adapter ou de s'acclimater aux changements environnementaux.

En particulier, nous allons tester l'hypothèse selon laquelle les comportements liés aux stratégies d'histoire de vie (date de ponte, soin parental) et les capacités cognitives (apprentissage) sont parmi les premiers moyens utilisés par les oiseaux pour s'acclimater ou s'adapter aux variations socio-écologiques de leur environnement. Nous utilisons une approche corrélationnelle où, grâce à un suivi d'individus avec identification unique, nous pouvons mettre en évidence une relation entre capacité cognitive (en milieu naturel), plasticité comportementale (milieu naturel et volière), et stratégies d'histoire de vie et leurs conséquences sur le succès reproducteur et la dynamique des populations. Pour tester notre hypothèse, nous proposons d'étudier sur 5 ans des populations d'oiseaux communs (Mésanges charbonnières, bleues, nonnettes) résidants dans des environnements contrastés selon un gradient d'altitude et d'urbanisation. Ces contrastes écologiques permettent de comprendre comment les animaux s'adaptent et s'acclimatent à des changements dans leurs environnements. L'étude pluriannuelle permet d'évaluer l'effet des variations saisonnières et annuelles de l'environnement (écologiques, sociales) sur la dynamique des populations, leur productivité (fitness), les comportements et les capacités cognitives. A l'issue de ce projet, nous aurons une meilleure compréhension de l'importance des capacités cognitives dans l'acclimatation à des environnements contrastés via les comportements sociaux et les stratégies de reproduction, ainsi que les conséquences de ces modifications sur les populations d'oiseaux sauvages.

Cette demande comprend 8 procédures : 1) capture, marquage, et mesures morphologiques des oiseaux, 1a) caractérisation des stratégies comportementales à l'aide de marques électroniques, permettant l'identification sans manipulation, 2) suivi de la nidification, 3) quantification de l'investissement dans les œufs, 4) quantification des soins parentaux (nourrissage des oisillons), 5) mesures de la cognition et recherche de nourriture en milieu naturel, 6) mesure de la compétence sociale (flexibilité comportementale) en milieu naturel, 7) mesure des liens entre compétence sociale, cognition, environnement, et gènes.

La majorité des procédures effectuées dans ce projet sont réalisées en milieu naturel avec un minimum de contact avec les oiseaux. Les données collectées nous permettront de quantifier la dynamique des populations provenant d'environnements différents (procs1-2), de comprendre le rôle de comportements clefs (procs3-6), et d'identifier les liens génétiques entre ces comportements (proc7) dans ces environnements contrastés.

En application des 3R, notamment via le développement de nouvelles technologies et protocoles participatifs sans contraintes pour l'animal permettant de réduire le stress induit, nous pouvons mener cette étude novatrice avec les tailles d'échantillons nécessaires à une approche populationnelle tout en ayant un impact minime (voir nul) sur les comportements naturels des animaux. Ainsi, notre recherche sur la cognition, le comportement, et la dynamique des populations se conforme aux principes éthiques, en minimisant les contraintes sur le bien-être animal.

La règle 3R a été appliquée à la conception de ce projet.

#### Remplacement

Etudier le rôle que jouent les comportements et la cognition pour limiter les effets de contrastes écologiques sur les populations constitue une nouvelle approche et ne peut donc pas se faire par l'analyse de données existantes comme nous l'avons fait ailleurs. Par ailleurs, les effets complexes de l'environnement nécessitent une étude en milieu naturel, car des approches de modélisation ne sont pas adaptées. Notre choix de modèle – les mésanges – se justifie en partie par le fait que ces espèces tolèrent bien des suivis et des manipulations en milieu naturel ainsi qu'en captivité. Leurs populations sont assez importantes pour avoir les échantillons donnant la puissance statistique nécessaire pour notre approche populationnelle.

#### Réduction

Une littérature importante sur ces espèces nous permet de mieux cibler les tailles d'échantillons nécessaires et donc de réduire nos interventions et facilite des comparaisons à d'autres populations. Afin de mettre en évidence l'impact des gradients écologiques sur les comportements et la reproduction au cours du temps, et donc un effet de sélection, nos modèles statistiques nécessitent une taille d'échantillon minimale de ~120 individus par condition (4 conditions) par an (procs2-6). Ceci implique la capture ~1050 adultes chaque hiver (>50% sont résidents) et ~300 adultes chaque printemps (<50% restent entre hiver et printemps) pour un total de 6750 adultes sur 5 ans. Pour estimer la survie, nous allons baguer tous les oisillons au nichoir avant envol (~1400/an ; 7000 en 5 ans). Enfin, pour étudier les gènes sous-jacents la cognition et la compétence sociale en captivité (proc7), un minimum de 300 mésanges charbonnières seront capturées en milieu naturel et relâchées au bout de 30 jours. Ce nombre est conditionné par la taille minimum nécessaire pour l'identification des gènes subjacents des traits d'après Perrier et collègues. Ainsi, un total de 14050 oiseaux seront capturés et marqués au cours des 5 ans d'étude.

#### Raffinement

Notre but étant d'étudier des comportements naturels et leurs impacts sur le succès des individus, nous employons des techniques ayant un minimum d'impact sur les oiseaux, sinon la pertinence scientifique de nos résultats sera mise en doute. Pour se faire, nous avons développé de nouvelles technologies (Mangeoires/nichoires électroniques) et méthodes (vision par ordinateur) qui permettent d'étudier le comportement, la cognition et la reproduction en milieu naturel en minimisant les actes de captures/recaptures, manipulation, et détention des animaux qui sont sources de stress pour les animaux sauvages. La procédure 1a vise à raffiner les méthodes de baguage avec puce électronique pour atteindre un seuil de blessure <1%. Grâce au baguage des adultes, nous pouvons

étudier les réseaux sociaux, le fourragement, la survie, la cognition et les soins parentaux des oiseaux en liberté. Cependant, nous utilisons des manipulations en milieu naturel ou en captivité à court terme quand des méthodes observationnelles ne permettent pas de répondre à nos questions (proc7).

**19922** Les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés.

Communément appelé « crise cardiaque », l'infarctus du myocarde (muscle cardiaque) correspond à une destruction du muscle cardiaque suite à l'obstruction d'une artère, appelée artère coronaire, qui alimente le cœur en sang. Le défaut de vascularisation est alors responsable d'une diminution (occlusion partielle) voire un arrêt (occlusion totale) de l'apport d'oxygène (hypoxémie) et de nutriment au tissu cardiaque. On parle alors d'ischémie myocardique. Cette ischémie va être à l'origine d'un dysfonctionnement et d'une destruction des cellules constituant le cœur, les lésions d'ischémie. La gravité de l'infarctus dépend de la durée de l'occlusion et de la taille du territoire ayant subi l'ischémie : plus l'ischémie est longue et la zone est grande, plus l'infarctus sera important.

En France, chaque année, environ 120 000 personnes sont victimes d'un infarctus avec une mortalité de 10% lors de l'événement et un taux de mortalité à un an de 15%. La première mesure thérapeutique consiste à rétablir la circulation dans l'artère coronaire obstruée pour réapprovisionner le cœur en oxygène et en nutriment. C'est la reperfusion. Cependant, bien que nécessaire et efficace pour stopper les lésions ischémiques, cet apport brutal d'oxygène et de nutriments va être à l'origine de nombreux effets délétères sur les cellules cardiaques, ce sont les lésions de reperfusion qui vont venir s'ajouter aux lésions ischémiques déjà présentes.

A long terme, la perte de tissu cardiaque "fonctionnel" induite par l'infarctus va conduire à une diminution de la fonction du cœur et à ce que l'on appelle l'insuffisance cardiaque (IC), la complication majeure post infarctus. L'IC correspond à l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant au bon fonctionnement des différents organes du corps. C'est une maladie chronique et complexe caractérisée par une anomalie de la structure et/ou de la fonction du cœur conduisant inévitablement à sa défaillance. L'IC est associée à une augmentation du risque de décès et à une survie médiane de 4 ans après l'infarctus.

D'un point de vue pharmacologique, il existe à l'heure actuelle différentes stratégies thérapeutiques. En premier lieu, il est possible de cibler et de limiter les lésions d'ischémie et/ou de reperfusion survenant au moment de l'évènement et ainsi de réduire la taille de l'infarctus. Ensuite, une fois que la perte du tissu myocardique est définitive, il est devenu alors nécessaire d'envisager une prise en charge à long terme afin de limiter la progression de l'IC et qui aura pour cible le remodelage cardiaque et le maintien et/ou la restauration de la fonction cardiaque.

Afin de tester les nouveaux médicaments, de différents modèles ont été développés. Parmi les modèles reproduisant le mieux les mécanismes cellulaires et tissulaires opérant pendant et après un infarctus figure le modèle d'ischémie myocardique chez le rongeur. Ce modèle consiste à provoquer de façon chirurgicale l'occlusion de l'artère coronaire antérieure gauche. Puisque le rat présente un système cardiovasculaire proche de celui de l'Homme, les mêmes mécanismes cellulaires et les mêmes conséquences fonctionnelles sont observés lors d'une ischémie-reperfusion faisant de ce modèle un modèle de choix pour tester l'efficacité de candidats médicaments.

Dans ce projet, en tant que prestataire de services pour différents laboratoires pharmaceutiques développant des candidats médicaments, nous sommes responsables de la partie *in vivo* (chirurgie, administration des composés testés, suivi des animaux et évaluation de l'efficacité des composés testés). Ainsi, l'utilisation des modèles d'ischémie et d'ischémie-reperfusion présentés dans ce projet a pour but de tester et d'évaluer les effets des nouveaux candidats médicaments de nos sponsors.

L'étude d'efficacité d'un composé constitue une série expérimentale qui comporte 5 groupes d'animaux. Compte tenu de notre retour d'expérience, de la variabilité intrinsèque au modèle (taille de la zone ischémisée) et inter-individuelle (vascularisation des animaux) le nombre d'animaux par groupe est porté à 15. A raison de 15 séries expérimentales sur 5 ans, le nombre d'animaux utilisé pour ce projet est de 1125 rats.

Le projet présenté s'inscrit dans la règle des 3R.

- Remplacement : l'objectif étant d'obtenir une preuve de concept d'efficacité de ces nouveaux composés *in vivo*, l'utilisation de rongeurs est nécessaire afin d'évaluer l'effet sur un organe entier (taille d'infarctus) et les conséquences fonctionnelles à plus long terme (IC).

- Réduction : Les données préalables obtenues sur ce modèle ont permis d'établir les effectifs d'une série expérimentale à 75 animaux répartis en 5 groupes de 15 animaux. L'étude d'efficacité d'un composé constitue une série expérimentale. A raison de 15 séries expérimentales réparties sur 5 ans, le nombre total d'animaux pour ce projet est de 1125.

- Raffinement : A l'exception des 24 heures succédant la chirurgie, les animaux seront hébergés par 2 ou 3 (selon la réglementation en vigueur) en présence d'enrichissement. Lors de la chirurgie, les animaux seront profondément anesthésiés avec un mélange d'anesthésiques chimiques. S'agissant d'une procédure avec un réveil, une analgésie péri et post-opératoire supplémentaire sera administrée afin d'offrir la meilleure couverture analgésique possible. L'ensemble des expérimentations seront effectuées par un personnel compétent et entraîné et une importance toute particulière sera portée au suivi des animaux afin de prévenir et de remédier au plus vite à toute apparition de douleur ou de mal-être. Les points limites seront également fixés avant le début des expérimentations.

#### **19923** -Contexte :

Le système immunitaire a évolué pour limiter les effets négatifs exercés par les agents pathogènes sur l'homéostasie de l'hôte. Cette stratégie de défense repose sur l'action concertée des composantes innées et adaptatives du système immunitaire qui détectent et ciblent les agents pathogènes en vue de leur confinement et de leur destruction. Ainsi, nous travaillons ici autour de l'inflammation aiguë pour comprendre comment elle est gérée par l'organisme et proposer des potentielles thérapeutiques.

-Objectif scientifique : Notre programme de recherche vise à comprendre comment nos drogues exercent un effet anti-inflammatoire et protecteur des tissus. Ils pourraient alors être utilisés comme traitement des inflammations aiguës.

Notre objectif est d'étudier les voies moléculaires qui, une fois dérégulée, vont augmenter la susceptibilité aux maladies auto-immunes telles que le lupus érythémateux systémique.

#### PROCEDURE 1

Dans un modèle murin d'hépatite aiguë, différentes drogues seront administrées. L'objectif de cette procédure est de caractériser les cellules dendritiques et les hépatocytes et d'identifier les potentiels effets protecteurs des drogues.

#### PROCEDURE 2

Dans un modèle murin d'inflammation pulmonaire aiguë, différentes drogues seront administrées dans le but d'évaluer leurs potentiels effets protecteurs sur l'inflammation aiguë.

-Retombées attendues :

Nous avons donc pour but de tester le potentiel effet thérapeutique de nos drogues lors d'une inflammation ainsi que lors d'une auto-immunité chez la souris.

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

Le rôle de la réponse intégrée au stress et de ces molécules associées devra être testé dans des modèles animaux pertinents d'inflammation et d'auto-immunité pour déterminer leur importance réelle pour la physiopathologie d'organismes entiers.

## REMPACEMENT :

En amont des expérimentations *in vivo*, une étude *in vitro* sur des lignées de cellules humaines sera réalisée afin de déterminer l'effet des drogues sur la réponse intégrée au stress. Toutefois, afin d'avoir une relevance plus clinique, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal. En effet, afin de confirmer nos résultats, il est nécessaire de justifier l'utilisation d'une thérapie potentielle dans un modèle animal.

## REDUCTION

Une étude statistique à partir de moyennes, d'écart-types, de puissance (définie à .80) et de taux d'erreur de type I (défini à 0.05) a permis de déterminer la taille d'échantillon nécessaire à la relevance statistique. De plus, la mutualisation de techniques et d'analyses sur un même animal réduisent le nombre d'animaux utilisés.

## RAFFINEMENT

L'étude préliminaire permettra un raffinement pour les procédures suivantes. En effet, la mise au point de procédures rigoureuses et la formation du personnel ainsi que le suivi quotidien de l'état de santé des animaux permettront le raffinement de ce projet.

Afin d'éviter quelconque douleur, souffrance ou angoisse des animaux, un analgésique (buprénorphine) sera administré par voie sous-cutanée à raison de 0.5mg/kg de poids corporel lorsque le seuil de douleur/souffrance/angoisse sera atteint.

Dès lors qu'un animal aura atteint un point limite, la souris sera euthanasiée dans le but de réduire toute douleur, souffrance et angoisse des animaux.

De plus, les souris seront hébergées dans des cages appropriées à raison de 5 souris/cage maximum (530cm<sup>2</sup>). La nourriture et l'eau seront à volonté. De l'enrichissement sera mis à disposition dans la cage pour assurer le bien-être de l'animal.

-Nombre total d'animaux inclus dans le projet :

En conclusion, un nombre total de 416 souris C57BL/6 J sera utilisé lors de ce projet avec 284 pour la procédure 1 et 132 pour la procédure 2. Le nombre d'individus pour la procédure 1 a été déterminé statistiquement par nos expériences passées. Ceux pour la procédure 2 a été déterminé statistiquement par une étude bibliographique approfondie.

## 19924 Contexte et hypothèse

Le cancer du sein de type triple négatif (TNBC) est un type de cancer très agressif résistant à la grande majorité des traitements anti-tumoraux actuellement existants. Une des raisons de cette résistance est que le TNBC inhibe les fonctions anti-tumorales des cellules du système immunitaire qui l'infiltrent. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes, dites pDC, promeuvent l'immunité anti-virale et anti-tumorale, principalement en produisant des molécules dites interférons (IFN). Cependant, dans d'autres contextes les pDC peuvent aussi induire une immunosuppression. En littérature il a été montré que la présence de pDC au sein des TNBC est un facteur pronostic favorable dans des stades précoces, mais défavorable dans des stades avancés. Notre hypothèse est qu'à des stades précoces du TNBC les pDC promouvraient l'immunité anti-tumorale via la production d'IFN, mais qu'avec la progression du TNBC la tumeur inhiberait ces fonctions et promouvrait plutôt des fonctions immunosuppressives.

### Objectifs

Afin de vérifier notre hypothèse nous allons effectuer nos études chez la souris. Nous disposons de modèles murins permettant soit d'identifier spécifiquement les pDC par fluorescence soit de les éliminer sélectivement et constitutivement. Nous disposons aussi de la lignée tumorale murine de TNBC E0771 qui, en fonction des nombres de cellules injectées, reproduit des stades précoces (régressifs) ou avancés (progressifs) de la tumeur. Cette lignée sera implantée en orthotopique dans les coussinets adipeux mammaires des souris. Grâce à l'implantation de la lignée E0771 dans nos modèles murins nous allons d'abord évaluer si le contrôle de la tumeur est affecté par l'absence

des pDC et, si oui, par quels mécanismes. Ensuite, nous évaluerons si l'injection intratumorale de molécules synthétiques capables de promouvoir la production d'IFN par les pDC inhibe la croissance du TNBC. Si tel est le cas nous déterminerons quelle est la contribution des pDC et les mécanismes sous-jacents.

#### Avantages et dommages

Si notre hypothèse de travail se confirme correcte, cela aura l'avantage de permettre de développer de nouveaux traitements ciblant les pDC et capables d'inhiber ou, au moins ralentir, la croissance de cancers agressifs, comme le TNBC. Les dommages seront contenus en limitant autant que possible le nombre d'animaux nécessaire pour effectuer nos études et en assurant un suivi quotidien des animaux lors des expériences.

#### Conformité de la règle des 3R

##### Remplacement :

Ce projet nécessite la mesure de différents paramètres de la réponse immunitaire au cours du développement *in vivo* d'un modèle de cancer du sein. Ainsi l'intégration d'un système vivant et complet est indispensable. La physiopathologie de la souris est suffisamment proche de celle de l'homme pour que son étude nous permette d'accroître nos connaissances sur le fonctionnement du système immunitaire chez l'homme. Par ailleurs, la taille, la rapidité du cycle de reproduction et la génétique de la souris en font le modèle le mieux approprié pour les études envisagées pour lesquelles des animaux génétiquement modifiés sont nécessaires. Ainsi le modèle murin est un modèle de choix pour notre étude.

##### Réduction :

Nous utiliserons 547 souris pour mener à bien cette étude. Tous ces animaux seront sous fond génétique homogène C57BL/6J pour nous permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés en évitant au maximum les variabilités interindividuelles des animaux sous fonds génétiques mixtes. Ainsi, chaque expérience devrait pouvoir être répétée indépendamment deux fois, avec 4-5 animaux par groupe, minimum requis pour s'assurer de la bonne reproductibilité des résultats.

##### Raffinement :

Pour limiter le stress des animaux, les souris seront élevées dans des animaleries conventionnelles exemptes d'organisme pathogène spécifique (EOPS). La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées et régulées. Un animal bénéficiera d'au moins 100 cm<sup>2</sup> de surface. Les animaux seront gardés tant que possible en groupes sociaux stables formés d'individus compatibles. Ils disposeront de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs, notamment pour les animaux placés en hauteur car trop exposés à la lumière. Pour les animaux affaiblis, l'accès à la nourriture et à l'eau sera favorisé. Un système de scoring de la douleur sera scrupuleusement appliqué, comme indiqué en détail dans les procédures, pour évaluer les signes de souffrance relatifs à l'expérimentation en cours, et les animaux atteignant les points limites définis seront immédiatement euthanasiés.

**19925** Ce projet d'élevage de souris NOD foxp3 GFP va permettre d'étudier 2 thématiques différentes : l'étude des récepteurs à la surface des lymphocytes T (appelé répertoire TCR) et la modulation des lymphocytes T régulateurs.

La 1<sup>er</sup> thématique porte sur l'étude du répertoire TCR (T Cell Receptor) des lymphocytes T chez la souris. Le TCR est le récepteur situé à la surface des lymphocytes T qui permet de reconnaître un antigène (présent à la surface d'une bactérie, d'une cellule infectée ou tumorale, etc...). En comparant les TCR de souches murines saines à celui de souches déclenchant spontanément des maladies auto-immunes (MAI) comme le diabète de type 1 (DT1), nous pourrions être en mesure de découvrir des antigènes spécifiques de la maladie. La caractérisation de ces TCR spécifiques d'antigènes particuliers pourront être considérés comme des biomarqueurs spécifiques des MAI, mais aussi de développer des immunothérapies spécifiques applicables chez l'homme.

La seconde thématique porte la modulation des lymphocytes T régulateurs (LTregs). Les LTregs sont des cellules du système immunitaire qui permettent de contrôler les lymphocytes T conventionnels. Leur rôle est donc essentiel pour l'équilibre du système immunitaire et donc pour qu'un individu ne développe pas de maladie auto-immune (MAI). En effet, dans les MAI comme le diabète de type 1 (DT1), les LTregs sont généralement déficitaires de manière quantitative et/ou qualitative. Il est donc essentiel de valider nos immunothérapies visant à moduler les LTregs dans des modèles spontanés de MAI comme le DT1.

Dans ces 2 études réalisées au sein de l'animalerie où se déroulent les expériences *in vivo* (animalerie d'expérimentation), nous avons besoin d'animaux développant spontanément une MAI. Les souris NOD (Non Obese Diabetic mice) sont des animaux qui développent spontanément un DT1 similaire à celui des humains. Ce modèle est connu et utilisé depuis longtemps dans les laboratoires de recherche; c'est un modèle parfaitement connu et adapté à nos études sur l'étude des TCR et à celle des LTregs dans les MAI. De plus nos animaux NOD expriment la GFP (Green Fluorescent Protein), qui est une molécule fluorescente dans les LTregs ce qui va faciliter leur isolement et leur étude.

Cette demande de projet concerne donc l'élevage de la lignée murine NOD Foxp3 GFP, à phénotype dommageable car pouvant développer spontanément un diabète de type 1, au sein de l'animalerie où sont élevées nos animaux transgéniques (animalerie d'élevage). Les animaux générés seront ensuite transférés à l'animalerie d'expérimentation où seront réalisés les différents protocoles liés aux 2 études citées précédemment. Pour réaliser ces projets, 1636 souris sont nécessaires sur les 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 le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ».

Remplacement : l'aspect spontané, non induit, et donc physiologique du développement du diabète chez ces animaux, ainsi que le caractère transgénique par l'expression ciblée de la GFP font que ces animaux ne peuvent pas être remplacés ni par un modèle *in vitro* ni par un autre modèle animal.

Réduction : la majorité des animaux utilisés devront être des femelles. En effet l'incidence naturelle de la maladie chez les femelles peut atteindre 80% à 1an de vie alors qu'elle n'est en moyenne que de 20% chez les mâles. Il est donc plus intéressant d'observer le répertoire TCR ou l'effet de nos immunothérapies chez les femelles NOD. Les mâles seront utilisés dans certaines expériences comme contrôles ou comme mâles reproducteurs. Les mâles non utilisés seront euthanasiés au moment du sevrage. Les procédures expérimentales seront optimisées afin de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Par exemple, seules les stratégies validées *in vitro* seront testées chez l'animal. Des études exploratoires sur un petit nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un nombre plus important d'animaux.

Raffinement : finalement, l'obligation de raffinement sera également prise en compte dans l'élevage des animaux. Le diabète peut se développer spontanément à partir de 10 semaines d'âge. Les animaux seront surveillés étroitement par les zootechniciens en charge de l'élevage et les signes de diabète seront diagnostiqués: polyuries, poil hirsute, dos voûté et glycosurie au besoin. Dès qu'un animal sera diagnostiqué comme malade il sera alors euthanasié dans les 48h. De plus l'environnement de l'animal sera enrichi afin d'améliorer ses conditions d'hébergement.

**19926** L'objectif de ce projet est de tester de nouvelles approches thérapeutiques pour la dystrophie myotonique (DM1). La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, une myotonie, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une hypotonie, des problèmes respiratoires sévères et des défauts de succion et de déglutition et par



un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nous avons développé un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Nous utiliserons notre modèle afin de tester de nouvelles approches thérapeutiques et voir si elles améliorent les symptômes observés chez la souris. Afin de limiter l'utilisation d'animaux, les outils thérapeutiques sont d'abord testés dans des modèles cellulaires afin de valider leur efficacité. Différentes doses seront ensuite testées dans des expériences pilotes avec un petit nombre d'animaux. Puis le test final sera réalisé avec des lots suffisants pour permettre d'obtenir des résultats statistiques fiables. Ces études précliniques sont indispensables avant de mettre en place les essais cliniques chez l'homme.

La majorité de nos études consiste à faire des injections chez la souris, et à tester avec des tests non invasifs la fonction musculaire et le comportement. Des études seront aussi réalisées sur des prélèvements prélevés après euthanasie de l'animal selon les procédures standards, réalisées dans le respect de l'éthique animal. D'après nos études antérieures, nous avons pu établir, en prenant en compte la variabilité phénotypique observée dans notre modèle, le nombre minimum de souris à utiliser par lot. Plusieurs outils thérapeutiques seront testés selon les mêmes procédures. Au total nous utiliserons 1344 souris pour ces études précliniques.

Ces animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement.

**19927** Le système vasculaire lymphatique a pour but de drainer les graisses, les liquides interstitiels, les macromolécules et les cellules immunitaires afin de maintenir l'homéostasie tissulaire.

En condition pathologique, il joue un rôle primordial dans le cancer. En effet, le système lymphatique est le premier site de dissémination métastatique des tumeurs solides, notamment au niveau des ganglions lymphatiques.

La lymphangiogenèse, croissance de nouveaux vaisseaux lymphatiques à partir de vaisseaux préexistants, se développe à la fois sur le pourtour des tumeurs et dans le ganglion sentinelle afin de préparer la « niche métastatique ». Bien que ce processus ait été clairement démontré au cours des 20 dernières années, les mécanismes moléculaires restent encore à élucider.

Dans ce projet, nous postulons que la croissance du système vasculaire lymphatique péri-tumoral est stimulé à la fois par la tumeur primaire, mais également par son microenvironnement (tissu adipeux et fibroblastes). Nous postulons qu'en ciblant le microenvironnement tumoral, nous allons pouvoir réduire la lymphangiogenèse et inhiber la formation de métastases. Afin d'identifier des cibles thérapeutiques anti-lymphangiogéniques, nous allons utiliser trois modèles murins de tumeur solides ainsi qu'un modèle spontané de carcinome mammaire.

En parallèle, nous allons développer un nouveau modèle original de détection des métastases ganglionnaires par injection de nanoparticules dans le système lymphatique.

Cette étude nécessitera l'expérimentation sur 220 animaux. En effet, le cancer étant une maladie faisant intervenir plusieurs types cellulaires incluant les cellules tumorales, le système circulatoire lymphatique et sanguin, le système immunitaire, ainsi que l'ensemble des composants cellulaires de la matrice, 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". Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellules, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour avoir un test statistique permettant de tirer une conclusion, 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. En cas

d'atteinte de point limite (animal prostré, poil hérissé, perte de poids dépassant les 10 pourcents du poids total de départ), l'arrêt des souffrances sera réalisé par euthanasie. 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 si nécessaire.

**19928** Le cancer du sein représente aujourd'hui une des premières causes de mortalité chez les femmes françaises. Son diagnostic repose sur de l'imagerie par rayons X et des prélèvements de tissus, invasifs et douloureux, afin de caractériser la tumeur et prescrire le traitement associé. Cependant, ces examens ne peuvent être réalisés de façon répétée au cours du traitement. Il n'existe donc pas aujourd'hui de modalité d'imagerie non-invasive permettant d'effectuer un suivi de traitement.

Nous proposons d'utiliser les ultrasons ultrarapides pour caractériser l'évolution de la tumeur, en mesurant des paramètres dont le lien direct au développement tumoral est connu :

- La rigidité de la tumeur
- L'orientation des fibres tissulaires
- L'irrégularité de sa vascularisation
- La proportion de petits vaisseaux

Le but ultime de ce projet est de proposer un protocole d'acquisition non-invasif et non-ionisant permettant de suivre la réponse au traitement des patientes, et adapter la thérapie en conséquence. Ce projet clinique nécessite au préalable d'obtenir des données préliminaires démontrant la faisabilité de mesurer ces différents paramètres d'imagerie in-vivo, en vue d'un passage chez l'homme. C'est pourquoi à ce stade, le recours à l'animal est nécessaire pour ce projet.

Nous étudierons sur une durée de 5 ans des souris transgéniques développant spontanément des tumeurs mammaires dans leur environnement, modèle le plus pertinent pour l'application clinique de cette étude au cancer du sein. Un total de 240 souris sera imagé régulièrement de façon non-invasive, tout au long de l'évolution de la tumeur et sous anesthésie pour limiter le stress de l'animal. Chacun des 4 paramètres décrits ci-dessus sera mesuré et comparé à une observation du tissu tumoral au microscope. Nous vérifierons également que leur évolution au cours de la croissance tumorale paraît pertinente et informative afin de conclure sur la faisabilité de notre imagerie pour le suivi de l'évolution tumorale.

Nous étudierons 178 souris transgéniques à des stades différents d'évolution de la tumeur. Ce chiffre représente le minimum d'animaux nécessaires d'après un calcul statistique prenant en compte les pertes et problèmes éventuels.

62 souris seront utilisées dans une première phase de mise au point du protocole d'imagerie, afin d'éviter des séances d'imageries non concluantes sur les animaux suivants, et valider la reproductibilité de nos mesures, pour une Réduction au minimum du nombre d'animaux total. Un grand soin sera apporté au Raffinement des conditions de vie des animaux, en particulier les souris développant un cancer qui seront surveillées quotidiennement pour évaluer leur état. Des points limites ont été définis au-delà desquels toute expérimentation sur l'animal concerné cessera. Les animaux seront placés par groupe de 3 dans des cages propres enrichies.

Les différentes techniques d'imagerie proposées et le protocole d'acquisition d'images ont été préalablement testés et vérifiés sur des modèles in-vitro afin de maximiser le Remplacement des modèles animaux.

**19929** Contexte scientifique du projet :

Prédire les conséquences du changement climatique sur la biodiversité est une question qui domine actuellement la recherche scientifique. Les scénarios suggèrent que l'extinction massive des espèces va s'accélérer avec l'augmentation de la température, au point que 15 à 37% des espèces pourrait avoir disparue d'ici 2050. Les espèces peuvent répondre au changement climatique en changeant leur phénotype (i.e. caractéristiques apparentes des individus) afin d'être mieux adapté

aux nouvelles conditions climatiques. Un grand nombre de recherches ont ainsi montré que le réchauffement climatique peut modifier le phénotype c'est-à-dire la morphologie, la physiologie et le comportement d'individus de nombreuses espèces. Ces modifications peuvent améliorer l'adaptation des espèces à un climat plus chaud. Cependant la réponse d'une espèce au réchauffement climatique reste étudiée principalement de manière théorique et encore trop rarement de façon empirique. En effet, le suivi phénotypique et génotypique, nécessaire pour étudier la réponse, est difficile à réaliser en milieu naturel sur l'échelle temporelle du changement climatique et il est d'autre part difficile d'isoler les effets directs du changement climatique des effets d'autres changements concomitants (e.g. dégradation de l'habitat). Dans ce contexte, les expériences réalisées en milieu semi-naturel lient parfaitement les exigences des conditions contrôlées en laboratoire au réalisme écologique. Elles sont hybrides entre un suivi à long terme en milieu naturel, possédant toute la complexité écologique des systèmes naturels, et des expériences de réchauffement climatique en laboratoire, permettant de recréer un climat futur dans un environnement plus artificiel. En simulant les conditions climatiques futures au sein d'un milieu spatialement et naturellement pertinent au niveau écologique, cette approche permet d'émettre des prédictions à relativement court terme sur les effets futurs du réchauffement climatique, une menace environnementale majeure, sur la persistance des populations naturelles et l'adaptation des espèces et mettre en place des plans de conservation efficaces.

Objectifs du projet :

L'objectif est d'étudier les mécanismes de réponses des espèces au réchauffement climatique. Pour ce faire nous effectuons des suivis de populations de triton palmé (*Lissotriton helveticus*) vivant dans des conditions thermiques différentes afin d'étudier les différences et les changements phénotypiques des individus au sein de ces populations.

Espèce modèle :

Dans ce projet, nous utiliserons le triton palmé, un petit amphibien largement répandu en Europe. Etant des ectothermes, leur température corporelle dépend directement de la température extérieure, ce qui en fait une espèce particulièrement vulnérable face au réchauffement climatique. En tant qu'espèce modèle, elle nous permettra de généraliser à terme nos conclusions à de nombreuses autres espèces de vertébrés ectothermes partageant les mêmes exigences écologiques que les tritons. Les tritons, naturellement présents dans un dispositif expérimental composé d'enclos semi-naturels de 100m<sup>2</sup> chacun, seront capturés. Chaque enclos représente un écosystème typique des prairies humides avec la présence de zones aquatiques permanentes, d'une diversité végétale riche et d'une large communauté d'invertébrés. La caractéristique de ce système est que les conditions climatiques de l'habitat peuvent être manipulées dans chaque enclos. Ainsi, deux conditions climatiques sont simulées : le « climat actuel » et le « climat chaud » dont la température est augmentée de 2°C, représentant les prédictions RCP4.5 de l'IPCC pour 2080 dans le sud de l'Europe. Tant dans les enclos « climat actuel » que « climat chaud », beaucoup de tritons sont présents naturellement et vivent en complète autonomie depuis plus de 8 ans. Par conséquent plusieurs générations ont évolué dans chacun des deux traitements climatiques. Description des expériences : Une fois en laboratoire, nous réaliserons des tests non invasifs afin de mesurer une série de traits fonctionnels au niveau thermique : 1) les traits morphologique (taille, poids, condition corporelle), 2) les traits physiologiques (niveau de mélanisme, température corporelle et métabolisme), 3) les traits comportementaux (activité, préférence et performance thermique dans un gradient de températures). Afin de mettre en exergue le processus évolutif sous-jacent, les mesures phénotypiques seront complétées par une analyse des différences de séquences et d'expression de gènes associés aux traits liés aux phénotypes thermiques (par exemple le gène *Mc1r* lié au mélanisme). Pour cela nous réaliserons, une seule fois seulement, un prélèvement d'un petit morceau de queue (<2mm), la queue de cette espèce se régénérant rapidement.

Balance dommages/bénéfices :

La mesure de ces traits nous permettra d'identifier les variations possibles de phénotypes entre les différentes conditions climatiques et ainsi d'évaluer comment le climat affecte les tritons et comment

ces derniers répondent à ces changements et potentiellement s'y adaptent. Cette étude pourra aider à prédire ce qui va se passer en milieu naturel dans le climat futur. Les dommages ne seront que minimes car peu d'individus, et seulement des juvéniles, seront capturés dans les enclos, les procédures réalisées sont légères et tous seront relâchés à leur endroit de capture à la fin des expériences.

Règle des 3R :

Remplacement : Notre objectif étant d'étudier la réponse d'un ectotherme face au changement climatique, ne pouvons par essence pas remplacer ce modèle par un modèle non vivant. Cependant, les tritons capturés par enclos seront au stade juvénile terrestre afin d'impacter le moins possible les populations en capturant des individus adultes.

Réduction : Notre objectif est de capturer 3 tritons par enclos dans 24 enclos (12 enclos en « climat actuel » et 12 enclos en « climat chaud »). Nous capturerons 72 tritons au total ce qui nous permet d'obtenir 36 tritons dans chaque condition climatique et le nombre de 24 populations nous permet d'avoir 12 répliques par condition de température et donc de pouvoir statistiquement se soustraire aux différences environnementales non contrôlées entre les différents enclos et ainsi pouvoir tirer des conclusions robustes de nos observations

Raffinement : Les individus capturés seront ramenés au laboratoire et gardés en terrariums individuels (17 x 34 cm) et en mésocosmes (bac de 170 cm de diamètre) dans des conditions optimales respectant la réglementation européenne ainsi que les exigences biologiques de l'espèce (Substrat humide, présence de nombreuse cachette et d'un bassin aquatique, nourriture distribuée ad libitum composé de micro grillons de vers de vase). Durant le maintien en élevage les animaux seront observés tous les jours et pesés 1 fois par semaine afin de vérifier leur état de santé. Les points limites sont pratiqués dans les cas où l'animal présente une apathie forte et une perte de masse de l'ordre de 25-30 % associée à une diminution d'appétit. Une euthanasie est alors envisagée, mais cela reste rarissime.

Les tritons seront capturés au printemps et relâchés dans leur enclos de capture durant l'été. Avant d'être relâchés, l'état de santé de tous les individus est vérifié de nouveau. Les individus présentant des anomalies sont gardés en élevage jusqu'à rémission.

**19930** D'après l'organisation mondiale de la santé, la dépression est actuellement la seconde cause d'invalidité dans le monde, et contribue à des causes de mortalités majeures telles que le suicide, les maladies cardiovasculaires et le cancer. De manière importante, la dépression affecte les personnes différemment selon le sexe : les femmes ont deux fois plus de chance de développer la maladie au cours de leur vie. Pourtant, les études précliniques se concentrent généralement sur des individus mâles, pour des raisons pratiques et historiques.

Malgré l'existence des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs), leurs résultats restent cependant limités avec 30 à 50% des patients ne répondant pas à ces traitements. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement de la dépression représente donc un enjeu de santé publique majeur. Au vu de la résistance aux antidépresseurs de certains patients, il est capital de développer de nouvelles pistes thérapeutiques personnalisées et prenant en compte le facteur du sexe. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation sont en train d'émerger. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par Stimulation Transcrânienne Ultrasonore répétée (rTUS) ;; dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le stress posttraumatique (PTSD). C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive, et qui permet de cibler une ou plusieurs régions de manière précise. Cependant, l'efficacité à long terme demeure inconnue, ainsi que les mécanismes sous-jacents.

Pour explorer les effets thérapeutiques de la rTUS dans le contexte de la dépression chez les deux sexes, il est avant tout important d'avoir un modèle robuste provoquant un comportement dépressif. C'est pourquoi nous proposons de tester un modèle d'instabilité sociale (IS) récemment validé par un autre laboratoire chez les deux sexes. L'objectif de cette première étude est donc de reproduire ces résultats avant d'évaluer des approches thérapeutiques comme la rTUS ou les antidépresseurs.

Pour cette expérience, 144 souris seront réparties en 4 lots expérimentaux de souris mâles et femelles.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans cette étude :

**Raffinement** : l'application de l'IS aux animaux peut être qualifié de sévérité légère : en effet, malgré une durée de 7 semaines, ce protocole est très proche des conditions d'élevage des animaux optimales au regard des normes en vigueur. La différence principale (le stress) consiste à changer les animaux de cage et de s'assurer qu'ils rencontrent les mêmes souris le moins possible. De plus, aucun enrichissement ne sera disponible comme il n'est pas indiqué dans la publication originale. Les animaux stressés et non-stressés seront hébergés séparément, car les contrôles ne subiront pas les changements de cage. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension des souris et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures.

**Remplacement** : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Les modèles de dépression chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, reposent sur l'observation du comportement de l'animal vivant.

**Réduction** : les effectifs sont optimisés, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle.

**19931** L'enfance est une période de construction de l'organisme, pendant laquelle l'activité physique régulière favorise la maturation des réseaux neuronaux. Or, certains enfants sont contraints à l'hypoactivité parce qu'ils sont alités (maladie, accident, paralysie cérébrale...). D'autres, qui souffrent d'un trouble développemental de la coordination, présentent des atypies sensorimotrices. L'hypoactivité ou les troubles moteurs précoces sont à l'origine d'un développement anormal durable de l'organisation et des fonctions du système nerveux, et conduisent à un affaiblissement de la mémoire et à un risque accru de pathologies à l'âge adulte (diabète, hypertension...).

Notre objectif est de contrecarrer les effets délétères de l'hypoactivité précoce sur les fonctions motrices et cognitives. Ce projet de recherche vise à mettre en évidence l'importance de l'irisine, molécule récemment découverte, qui est produite par le muscle pendant l'exercice et qui pourrait être le médiateur des effets bénéfiques de l'exercice sur le cerveau en développement. Nos hypothèses permettent de définir 3 axes de recherche : 1/ l'exercice chronique après une période d'hypoactivité précoce pourrait contrecarrer ses effets délétères sur les fonctions motrices et cognitives ; 2/ l'administration d'irisine pendant la période d'hypoactivité pourrait prévenir les troubles moteurs et cognitifs ; 3/ les effets bénéfiques de l'exercice et/ou de l'irisine dépendraient de mécanismes moléculaires au niveau cérébral.

Cette approche novatrice pourrait favoriser l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques et/ou préventives pour réduire l'apparition de troubles neurodéveloppementaux.

L'ensemble des procédures expérimentales nécessaires à l'accomplissement de ces études requiert un nombre total d'environ 2350 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 en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Le personnel impliqué est titulaire d'une autorisation pour la chirurgie animale.

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*.

**19932** Notre projet consiste à étudier l'influence de l'épigénétique sur la régulation de l'ADN dans l'Amyotrophie Spinale (SMA) et à étudier une nouvelle génération de vecteurs viraux utilisés dans des approches de thérapie génique pour cette maladie grave.

La SMA est une maladie génétique neuromusculaire touchant environ 1 naissance sur 6 000. Dans 95% des cas, cette maladie est provoquée par une mutation du gène Survival of Motor Neuron 1 (SMN1). Bien que ce gène soit exprimé dans l'ensemble des cellules de l'organisme, sa mutation se manifeste principalement par une dégénérescence progressive des neurones moteurs (appelés motoneurons) de la moelle épinière, qui conduit à une paralysie et dans les cas les plus sévères à la mort du patient.

Des mécanismes épigénétiques peuvent modifier la sévérité de la maladie. Le but de notre étude est donc multiple. Dans un premier temps il consiste à comprendre le rôle des modifications épigénétiques de l'ADN dans la SMA. Des recherches récentes ont montré que les symptômes de la maladie sont plus sévères quand il y a une augmentation de la méthylation sur certains gènes cibles. A ce stade le rôle de cette modification et de sa contrepartie (hydroxyméthylation) n'est pas connu. Cela représente le principal but de notre investigation c'est à dire déterminer chez la souris SMA l'influence de l'épigénétique sur l'expression des gènes. Puis dans un second temps d'agir sur cette régulation pour améliorer le phénotype des animaux malades. Nous étudierons également l'efficacité d'une nouvelle génération de vecteurs viraux en la comparant à celle ayant déjà fait ses preuves en thérapie génique afin de déterminer si une optimisation est encore possible (pour réduire la quantité de virus injectée lors des traitements thérapeutiques).

Pour la partie épigénétique, nous comparerons deux aspects : 1- le profil épigénétique de l'ADN et 2- l'expression de gènes, chez des animaux sains ou malades. Les gènes ayant une expression différente seront identifiés et nous essaierons de modifier leur expression.

Pour agir sur l'expression de ces gènes nous aurons à notre disposition plusieurs approches. Une chimique, avec l'injection de petites molécules, une thérapeutique avec l'utilisation de thérapie génique et une approche combinée (chimique + thérapie génique).

L'idée étant que l'injection de petites molécules potentialise l'effet de la thérapie génique.

La thérapie génique que nous envisageons est basée sur l'utilisation de vecteurs viraux que nous utiliserons comme transporteur pour délivrer aux cellules le gène SMN fonctionnel. Une fois injectés dans l'organisme, les vecteurs pénétreront dans les cellules afin d'y faire exprimer le gène qu'ils contiennent et l'injection de produits chimiques permettra en parallèle de réguler l'expression d'autres gènes, pour un effet thérapeutique majeur.

Une précédente étude publiée a montré qu'une injection intraveineuse de vecteurs exprimant le gène SMN permettait de faire exprimer efficacement la protéine SMN dans un grand nombre de tissus, y compris dans le système nerveux central. Des avancées scientifiques récentes ont permis la mise au point de nouvelles formes de vecteurs capables d'augmenter considérablement l'efficacité des traitements. Actuellement la thérapie génique est largement utilisée pour mettre au point des traitements contre des maladies neurodégénératives telles que la SMA ou la Sclérose Latérale Amyotrophique. Afin d'améliorer les traitements nous souhaitons tester une nouvelle génération de vecteurs. Leur efficacité sera comparée à celle des vecteurs utilisés actuellement en thérapie chez l'Homme. La nouvelle génération de vecteur pourrait de par son efficacité permettre de diminuer fortement la charge virale injectée lors des traitements et ainsi réduire considérablement les effets secondaires (réaction immunitaire, toxicité, ...).

L'ensemble de cette étude sera menée sur des modèles murins, et sa réalisation se fera dans le respect de la règle des 3R. Au total 487 animaux seront utilisés pour ce projet.

Remplacement : Des cellules issues de patient pourraient être utilisées pour étudier certains aspects de la pathologie mais elles ne peuvent pas répondre à nos questions sur l'efficacité et non-

toxicité des nouveaux vecteurs. Pour cela, l'étude sur les animaux est nécessaire afin d'établir la capacité des vecteurs à cibler les organes.

**Réduction :** Pour limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés les groupes seront constitués du nombre minimal nécessaire à une interprétation statistique viable ( $n=3/\text{groupe}/\text{sexe}$ ). Les animaux ne répondant pas aux exigences pour l'étude (porteur ou non de la maladie) seront systématiquement proposés pour d'autres études déjà validées. De plus sur chaque animal utilisé un maximum d'échantillons biologiques sera prélevé pour parer à toute nouvelle analyse à effectuer.

**Raffinement :** Ces animaux seront regroupés par groupe de 4 pour les mâles et par groupe de 5 pour les femelles au maximum. Dans chaque cage un enrichissement sera apporté sous forme de papier craft pour la confection des nids, voir avec des abris en carton si besoin. Lors des interventions d'injection, un anesthésiant adéquat sera utilisé et la qualité de l'anesthésie testée avant de procéder aux expérimentations. Enfin chaque animal sera suivi quotidiennement de sa naissance à sa mort et un contrôle du poids réalisé une fois par semaine avant l'apparition des symptômes de la maladie, autant de fois que nécessaire après l'apparition des symptômes afin de contrôler précisément les points limites qui une fois atteint entrainera automatiquement l'euthanasie de l'animal pour éviter toute souffrance excessive. De plus pour minimiser le stress des animaux, ceux-ci seront manipulés tout au long de l'expérimentation par un nombre limité de personnes pour créer une habitude souris/manipulateur. Pour la partie épigénétique le fait de suivre dès la naissance les animaux permettra également de limiter considérablement le stress de ceux-ci. Il est à noter qu'un soin particulier sera apporté aux animaux commençant à développer la maladie pour leur faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau. Ainsi des croquettes ou de la bouillie pourront être placés directement dans la cage, ainsi que de l'hydrogel en cas de besoin.

Pour les procédures sur animaux jeunes, l'utilisation d'anesthésie n'est pas possible car son utilisation serait plus néfaste (augmentation de la mortalité) que bénéfique. Cependant en cas de douleur post procédure opératoire les animaux pourront, en cas de besoin, se voir administrer des analgésiques. En cas de douleur aigue visible les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance inutile. Pour les procédures sévères réalisés sur animaux adultes, une anesthésie sera réalisée et un contrôle post opératoire sera réalisé afin de fournir en cas de besoin une analgésie aux animaux. En cas de douleur aigue, les animaux seraient immédiatement euthanasiés pour éviter toute souffrance inutile.

**19933** Avec un taux de croissance de 8,8% par an, l'aquaculture est le secteur agroalimentaire qui croit le plus dans le monde, et la moitié des poissons consommés proviennent de cette activité. A l'heure actuelle la connaissance du sexe tout comme l'appréciation du stress chez les poissons constituent deux préoccupations majeures pour les éleveurs. Le suivi du stress chez les poissons est relativement compliqué, car il impose un prélèvement qui lui-même peut déclencher une montée de production de l'hormone du stress : le Cortisol. Le développement d'alternatives plus aisées à mettre en œuvre, peu coûteuses et très fiables serait donc d'un grand intérêt pour la filière. Nous proposons ici l'utilisation de petites molécules impliquées dans la régulation de nombreux processus biologiques circulantes dans le sang (les micro-ARN) comme marqueur du stress (aigue et/ou chronique) chez trois espèces de poissons avec un intérêt majeur en aquaculture : Bar, Daurade et Turbot. Le but ultime du projet étant de développer un biocapteur à miRNA. Il sera conduit en deux phases : Recherche de miRNAs impliqués dans la réponse à différents stress chez la daurade (Phase 1) et identification des cibles de miARN trouvées dans la phase 1 chez le bar et le turbot soumis à des stress aigus de confinements (Phase 2). Un total de 240 poissons seront utilisés sur l'ensemble du projet (phase 1 et phase 2 confondues). La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet de la façon suivante : 1) Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage. 2) Réduire, en utilisant le minimum de poissons pour répondre à nos objectifs. Ainsi sur la phase 1, 120 poissons seront prélevés et seulement la moitié d'entre eux auront subi un stress chronique (succession de stress répétés). Pour la phase 2, 60 poissons seront prélevés pour le bar et 60 pour le turbot (30 de chaque espèce ayant subi un stress aigu). Ces effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et

de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés. Ils seront prélevés directement en condition d'aquaculture. 3) Le raffinement comprendra l'optimisation des conditions d'élevage pour cette espèce (nombre d'individus suffisants pour être en bancs, densité faible) et la mise en œuvre de procédures spécifiques et standardisées (comme l'anesthésie et l'euthanasie).

**19934** Les infections virales constituent un risque sanitaire majeur pour les équidés et provoquent des pertes économiques importantes pour la filière. L'épidémie actuelle de rhi-nopneumonie (mars 2021) en est une illustration. Malgré des besoins importants, l'arsenal thérapeutique pour lutter contre les infections virales est extrêmement limité. Si des vaccins efficaces ont bien été développés contre certains virus équin, la couverture vaccinale reste bien souvent insuffisante. Par ailleurs, l'efficacité de certains vaccins reste faible, en raison d'une couverture insuffisante chez une partie de la population équine ou à cause du phénomène d'échappement viral chez l'herpès virus équin 1 (HVE-1). Dans ce contexte, le développement de molécules aux propriétés antivirales est d'une grande utilité pour traiter les animaux développant des formes sévères ou incurables et pourrait contribuer à limiter la dissémination d'agents infectieux au sein des élevages.

Dans le cadre d'un premier projet, nous avons pu tester 2900 composés contre 3 virus équins dans un modèle *in vitro* de cellules équines infectées. Ces travaux ont permis d'identifier 4 molécules à activités antivirales *in vitro*. Ces molécules sont utilisées en thérapeutique chez l'homme, soit pour leur activité anti-tumorale, soit pour leur activité antivirale.

L'objectif de ce nouveau projet est de réaliser une étude pharmaco-toxicologique de ces quatre composés chez le cheval. Pour ce faire, la dégradation métabolique des quatre molécules sera d'abord évaluée *in vitro* à l'aide de microsomes hépatiques de foie de cheval. En fonction des résultats obtenus, les deux molécules qui auront montré les meilleures cinétiques de dégradation (les plus lentes) seront administrées aux ponettes pour évaluation *in vivo*. Ce travail est une étape préliminaire indispensable à la réalisation d'une étude d'efficacité chez l'animal.

Pour ce projet, quatre ponettes seront traitées avec des doses croissantes d'une molécule. Au total, deux molécules seront testées et une ponette supplémentaire servira de contrôle. Le devenir de chacune des molécules après son administration aux ponettes sera étudié en insistant plus particulièrement sur l'excrétion du principe actif et de ses métabolites. Ces molécules étant déjà disponibles commercialement chez l'homme, elles ont déjà fait l'objet de nombreuses études. Les paramètres cliniques, biochimiques et hématologiques seront explorés. Ces travaux permettront ainsi d'évaluer la pharmacocinétique et la toxicité de deux molécules à action antivirale chez le cheval.

Le projet respectera la règle des 3R selon les modalités suivantes :

Remplacer : Notre objectif étant une étude de non toxicité sur les équins, notre modèle animal ne peut pas être remplacé étant donné le suivi pharmaco-cinétique envisagé.

Raffiner : Nous optimisons la technique pour améliorer le bien-être des animaux : antalgiques et tranquillisants appropriés, soins avant, pendant et après la procédure, enrichissement du milieu (brosses, bois à ronger, ballons), apprentissages pour les prises de sang et prélèvements.

Réduire : Comme évoqué précédemment, nous avons testé 2900 composés contre 3 virus équins dans un modèle *in vitro* de cellules équines infectées. Ces travaux ont permis d'identifier quatre molécules à activités antivirales. Un deuxième modèle *in vitro* à partir de microsome de foie de cheval a permis de sélectionner deux molécules parmi les 4, qui présentaient une dégradation hépatique minimale. Le nombre d'animaux vivants utilisés a été réduit à son maximum puisque nous n'utiliserons que 4 animaux par molécule, donc 8 animaux au total, plus un animal contrôle soit 9 animaux au total.

**19935** L'omniprésence de micropolluants dans notre environnement et notre alimentation représente une question de santé publique, exacerbée par des études montrant la présence de certains d'entre eux, comme le glyphosate, dans les urines de nombreux citoyens européens. Certains



contaminants, sont des pesticides qui sont utilisés par les agriculteurs ou présents dans l'environnement comme le Chlorpyrifos, le Cyperméthrine, Glyphosate et le Prochloraz. Il existe peu d'études indépendantes qui évaluent l'impact d'une exposition chronique à des doses non toxiques. Ainsi, dans le cadre du projet Régional, nous exposerons des souris gestantes par administration orale à ces molécules aux doses déclarées comme sans effet nocif observable (en anglais : No Observable Adverse Effect Level, NOAEL) chez les rongeurs puis nous regarderons s'il y a un effet de ces molécules au cours de la puberté ou à l'âge adulte, sur le système nerveux central (hypothalamus), le comportement et le développement gonadique.

Le nombre total dans ces expériences sera d'un maximum de 440 animaux (25 femelles traitées, 15 animaux contrôles pour les accouplements, 200 animaux de la génération F1 et 200 animaux de la génération F2 seront analysés). Le projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Les effets des molécules ont déjà été caractérisés *in vitro* et les doses nocives *in vivo* ont été déterminées. Toutefois, il n'y a aucune méthode de remplacement à l'étude de la reproduction et des comportements.

Réduction: Le nombre d'animaux mis en élevage va permettre d'obtenir un nombre d'animaux suffisant (environ 10/sexe) pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. De plus, une autre molécule non présentée ici (metolachlore) ne sera pas testée, car des échantillons ont pu être prélevés dans une autre expérimentation par collaboration.

Raffinement : les animaux impliqués dans cette étude sont élevés dans les meilleures conditions d'élevage dans des cages en présence d'enrichissement (cabane en carton pour se cacher et des morceaux de cartons "crinklets" pour faire leur nid). Les expériences d'exposition ou d'analyse de comportement sont menées dans les plus courts délais possibles afin de minimiser leur inconfort et leur stress et de les remettre dans leurs cages en présence de leurs congénères. Les points limites, que nous utiliserons, seront l'apparence, le poids et le comportement. Les critères d'arrêt seront une posture voutée ou une démarche anormale, une perte de poids, ou une immobilité.

**19936** Le syndrome d'Ondine est une maladie génétique rare, constatée dès la naissance : le nouveau-né présente une hypoventilation (diminution de sa respiration), qui peut aboutir à l'arrêt complet de la respiration pendant le sommeil et parfois même à l'éveil. Actuellement, la seule prise en charge chez les patients est une ventilation mécanique pendant le sommeil et à vie.

Une caractéristique majeure de la maladie est l'absence de chémoréflexe (i.e. absence de réponse ventilatoire à l'augmentation de dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>)).

La maladie est provoquée par une mutation d'un gène déterminant dans le contrôle des grandes fonctions vitales comme la respiration.

Un modèle génétique murin a été obtenu par insertion génétique de la mutation la plus fréquemment retrouvée chez l'humain. Ce modèle récapitule les principales caractéristiques de la maladie : hypoventilation (diminution de la fréquence respiratoire) et absence de réponse au CO<sub>2</sub>. La mutation conduit à un arrêt respiratoire des souriceaux dans les heures qui suivent la naissance faute de traitement de support ventilatoire, tel que la ventilation mécanique. Ceci rend difficile l'utilisation de traitements pharmacologiques qui nécessitent un temps minimum nécessaire afin d'évaluer l'efficacité.

Récemment, la présence d'apnées obstructives – c'est à dire d'apnées durant lesquelles les voies aériennes supérieures sont obstruées – a été mise en évidence dans le modèle murin du syndrome d'Ondine, phénomène qui pourrait réduire la longévité des animaux et être en partie responsable de leur décès.

Le traitement de référence du syndrome d'apnée obstructive du sommeil chez l'Homme est l'application d'une pression positive continue (CPAP). Dans un premier temps, ce traitement transposé aux souriceaux mutés, pourrait donc diminuer voire abolir leurs apnées obstructives et améliorer leur profil respiratoire (notamment une augmentation de leur fréquence respiratoire).

L'un des objectifs du projet est de mettre au point un protocole de ventilation mécanique similaire à celle utilisée actuellement chez les patients atteints du syndrome d'Ondine. Cela nous permettrait de prolonger la durée de vie des souriceaux mutants et permettre ainsi d'évaluer les traitements pharmacologiques dont les délais d'action dépassent actuellement la survie de notre modèle.

Prolonger la durée de vie des souriceaux mutants nous permettrait de leur délivrer deux molécules pharmacologiques dont l'action pourrait corriger les défauts respiratoires.

Au total, le projet s'étend sur 36 mois et nécessite l'utilisation de 255 rongeurs (15 rats et 240 souriceaux, 120 mutants et 120 sauvages). Les animaux seront vérifiés chaque jour (nourriture, boisson, bien être).

Procédure 1 : Application d'une CPAP non invasive aux souriceaux mutants dans le but de soulager les apnées obstructives et donc d'augmenter la durée de vie des animaux. Nous utiliserons des souriceaux sauvages afin de contrôler les effets de la CPAP.

Procédure 2 : Mise au point de la ventilation mécanique sur 15 rats sauvages anesthésiés par injection intra-péritonéale. Les rats, plus gros et plus résistants que les souriceaux nous permettent d'accéder à des paramètres métaboliques non disponibles chez les souriceaux en raison de leur petite taille. Cette procédure nous permettra de valider l'efficacité de nos ventilateurs mécaniques.

Procédure 3 : Mise au point et adaptation de la ventilation mécanique sur la respiration et la survie de 30 souriceaux mutants et 30 souriceaux témoins anesthésiés par injection intra-péritonéale.

Procédure 4 : Effet d'un traitement pharmacologique, sur la respiration de 30 souriceaux mutants ventilés et 30 souriceaux témoins. Le traitement sera délivré en injection unique, sur animaux vigiles, par voie intra-péritonéale.

Procédure 5 : Effet d'un second traitement pharmacologique, sur la respiration de 30 souriceaux mutants ventilés et 30 souriceaux témoins. Le traitement sera délivré en injection unique, sur animaux vigiles, par voie intra-péritonéale.

Pour chaque procédure, les souriceaux et les rats seront euthanasiés 24h après l'expérience. Les géniteurs seront euthanasiés au bout de 40 semaines de vie.

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

- Remplacement : l'étude préclinique sur des animaux en développement est un préalable recommandé par l'Agence européenne de médicament pour les stratégies thérapeutiques pharmacologiques notamment pédiatriques, l'utilisation de l'animal ne peut être évitée.

- Réduction : Compte tenu de la grande variabilité inter-individuelle et de la forte mortalité des souriceaux mutants à la naissance, nous avons déterminé qu'un lot expérimental de 30 souriceaux par groupe était nécessaire pour tester nos hypothèses. De plus, en raison de leur robustesse et de la reproductibilité des expériences, 15 rats seront suffisants pour mettre en évidence l'efficacité de notre ventilateur mécanique. Les mesures de plusieurs paramètres de la respiration sur le même animal permettent de réduire le nombre d'animaux nécessaires et le nombre de manipulations par animal.

- Raffinement : nous utilisons des techniques de mesures non invasives à température constante pour respecter la physiologie de l'animal. Nos expériences ne sont pas douloureuses et ne doivent entraîner de souffrances aux animaux. Toutefois nous avons établi des critères de points limites adaptés à l'âge des souriceaux nous permettant d'identifier et de limiter la souffrance. Si les points limites sont atteints, les animaux seront euthanasiés.

Ici, notre modèle murin transgénique portant la mutation humaine récurrente permet de se rapprocher des conséquences de cette mutation chez l'Homme. L'approche dans un organisme vivant permet de voir les effets de la mutation dans un contexte physiologique. De plus, pour les médicaments à visée pédiatrique, l'agence européenne du médicament recommande des tests sur des rongeurs juvénile, afin de garantir la bonne qualité et l'efficacité du produit sur la population cible.

**19937** 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 maladie dans les pays développés et affectent 5 à 7% de la population. Le lupus érythémateux disséminé/systémique (LED) est une maladie 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 les causes du LED restent mal connues car complexes. Les lignées de souris utilisées dans le cadre de ce projet constituent des modèles uniques d'études de la maladie humaine car elles permettent d'évaluer: 1) l'hypertrophie des organes du système immunitaires dues à une accumulation de lymphocytes T anormaux; 2) la production d'auto-anticorps responsables de lésions rénales qui, chez l'Homme, sont la complication majeure du LED ; 3) l'augmentation des taux sanguins de cholestérol et de l'inflammation; 4) l'existence de différences de sévérité entre les deux sexes comme dans l'espèce humaine. Chez les patients atteints de LED, la sévérité des atteintes tissulaires est contrôlée par des médicaments inhibant de façon non spécifique la réponse immunitaire. 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. Ce projet a pour but d'évaluer les conséquences d'une dérégulation du taux de cholestérol circulant et des ses voies de synthèse/dégradation sur le développement et la sévérité du LED. Cette étude pourrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ne présentant pas les effets secondaires indésirables associés aux traitements actuels. 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, cette expérience pilote nous permettra d'analyser les liens entre le taux de cholestérol circulant et les processus inflammatoires physiologiques et pathologiques. 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. Cette expérience pilote permettra de déterminer l'effet d'une diète sur l'amplification d'une autoimmunité de faible sévérité afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés et de raffiner leur survie au cours des expériences et ainsi de respecter la règle des 3R. Le nombre total d'animaux sera de 64 souris compte tenu de la variabilité des réponses immunitaires individuel et comprendra des souris mâles ou femelles âgées de 6 à 30 semaines soit avant et après l'apparition du LED. Ce nombre d'animaux garantira la valeur statistique des résultats obtenus. 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 utilisés pour cette étude se limitera au nombre d'animaux nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement fiables. Comme il existe des différences de sévérité entre les deux sexes dans le développement de la maladie, nous élèverons à part égale des mâles et des femelles. Pour le « Raffinement », 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. De plus, le suivi quotidien des souris sera renforcé après 2 mois de diète car leur état général peut se dégrader avec le développement de l'obésité. Une grille de scores sera donc utilisée pour évaluer la sévérité de la pathologie et donc l'atteintes éventuelles des points limites. L'apparition d'atteintes cutanées auto-immunes constituera un marqueur précoce d'arrêt du protocole et de sacrifice des animaux. Cette étude permettra une meilleure compréhension des causes du LED et donc une amélioration de l'efficacité des traitements.

**19938** Les nerfs périphériques jouent un rôle essentiel dans la conduction des messages nerveux entre le cerveau et la périphérie. Ils sont vascularisés par des vaisseaux sanguins permettant l'apport en nutriments et en oxygène, nécessaires à leur bon fonctionnement. Toute dérégulation de ce

système vasculaire intra-nerveux peut avoir de lourdes conséquences pathologiques sur l'organisme. Nous pensons notamment qu'une dérégulation de ce système vasculaire intra-nerveux pourrait être impliquée dans le développement d'une pathologie : la neuropathie périphérique chimiquement induite.

Une neuropathie périphérique chimiquement induite est un effet secondaire majeur de nombreuses molécules anti-cancéreuses, comme c'est particulièrement le cas de l'oxaliplatine. Les patients touchés présentent une hypersensibilité en réponse à un stimulus tactile ou froid au niveau des mains et des pieds notamment. Ces symptômes, liés au dysfonctionnement de certains nerfs périphériques, sont très invalidants pour les patients et impactent lourdement leur qualité de vie. Dans les cas les plus avancés, la dégénérescence nerveuse est telle qu'elle peut conduire à l'amputation du membre atteint. A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement, autant préventif que curatif, à ces neuropathies périphériques chimiquement induites. La réduction ou l'arrêt du traitement anti-cancéreux est souvent nécessaire. Il est donc essentiel de mieux comprendre le développement de cette pathologie afin de pouvoir proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Ce projet s'inscrit dans ce contexte et vise à mieux comprendre les mécanismes impliqués dans le développement de ces neuropathies en s'intéressant notamment à l'implication du système vasculaire intra-nerveux. Pour ce faire, nous avons mis au point un modèle murin de neuropathie périphérique chimiquement induite par l'oxaliplatine. L'apparition des symptômes neuropathiques sont attestés par des tests comportementaux. Ce modèle nous permet d'étudier les conséquences du traitement à l'oxaliplatine sur le système vasculaire intra-nerveux par des études post-mortem. Notamment, nos études préliminaires tendent à montrer un lien entre la contraction des vaisseaux sanguins (vasoconstriction) et le développement de la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine. Nous voulons alors voir si cette vasoconstriction est responsable, au moins en partie, des symptômes neuropathiques induits par l'oxaliplatine. Pour cela, nous souhaitons administrer par injections des molécules vasodilatatrices utilisées chez l'Homme : le tadalafil, le bosentan et l'ambrisentan, afin d'induire la relaxation des vaisseaux sanguins intra-nerveux. Les mêmes tests comportementaux seront employés pour examiner l'effet de cette médication sur l'apparition des symptômes neuropathiques chez les souris. Si une augmentation de la vasoconstriction est impliquée dans le développement de la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine, nous nous attendons à voir une réduction des symptômes chez les souris. Des études post-mortem sur les nerfs sciatiques de ces animaux permettront l'analyse des conséquences cellulaires et moléculaires de cette piste thérapeutique. Ceci permettra d'affiner la compréhension des mécanismes impliqués dans le développement de la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine.

De plus, une médication à base de vasodilatateurs ne semble pas présenter de contre-indication chez les patients recevant une chimiothérapie anti-cancéreuse. Cette piste thérapeutique serait alors intéressante dans le traitement de la neuropathie périphérique induite par l'oxaliplatine.

L'animal modèle utilisé dans cette étude est la souris. Le nombre d'animaux total requis pour ce projet établi sur 5 ans est de 1120 animaux. Ce projet respecte les principes énoncés par la règle des 3R :

**Remplacement :** Ce projet modélisant la pathologie humaine et l'effet d'une potentielle solution thérapeutique nécessite la mesure de différents paramètres comportementaux et physiologiques ; il n'est pas possible de s'affranchir de l'expérimentation animale.

**Réduction :** le nombre d'animaux utilisé correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide ; chaque animal peut être utilisé pour plusieurs procédures ce qui permet de réduire le nombre d'animaux.

**Raffinement :** les souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin d'assurer au mieux le bien-être de l'animal en réduisant au minimum leur stress lors des manipulations. Nous avons déterminé des critères d'arrêt précoce pour lesquels les animaux seront pris en charge par l'administration de médication et la sortie des procédures.

**19939** 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, ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète. 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. 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'immunothérapies 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 qui sont spécifiquement impliquées dans la chronicité de l'inflammation telles que les lymphocytes B mémoires exprimant des IgG dirigées contre un antigène spécifique du soi donc délétère puisqu'elles attaquent de façon inappropriée les tissus de l'hôte (auto-anticorps). Eliminer de façon spécifique ces cellules ou les auto-anticorps pourraient conduire à limiter l'inflammation engendrée par ces populations. De nombreuses maladies auto-immunes impliquant des cellules B mémoires sécrétrices d'auto-anticorps délétères ont été référencées telles que les auto-anticorps anti-dsDNA impliqués dans le lupus, les auto-anticorps anti-DSG3, impliqués dans le pemphigus vulgaris etc.

Dans un premier temps, nous souhaiterions injecter différents types de peptides/protéines impliqué(e)s dans des maladies auto-immunes bien caractérisées afin d'immuniser les souris immunocompétentes et de créer une réponse cellulaire B mémoire avec sécrétion d'auto-anticorps. Également, il sera possible au lieu d'immuniser les souris, d'injecter directement le sérum des patients contenant les auto-anticorps d'intérêts ou même un auto-anticorps purifié au préalable par nos équipes *in vitro*. Nous souhaiterions injecter des peptides ou protéines immunogènes, des auto-anticorps isolés *in vitro* ou des sera provenant de patients impliqué(e)s dans le développement de nombreuses pathologies auto-immunes. (Procédures 1 et 2). Par la suite, nous souhaiterions tester différentes molécules thérapeutiques bispécifiques afin d'évaluer l'élimination des cellules B mémoires et/ou des auto-anticorps.

L'objectif est d'évaluer la pharmacocinétique et l'efficacité de plusieurs formats de molécules thérapeutiques bispécifiques à différentes doses avec deux types d'injections, en intrapéritonéale et via une pompe en sous cutanée dans différentes souches de souris immunocompétentes. Selon la souche des souris immunocompétentes utilisées, l'immunisation n'est pas la même et parfois selon le peptide ou la protéine injecté(e), il peut y avoir des différences importantes, c'est pourquoi nous avons besoin de sélectionner différentes souches et d'adapter la souche en fonction de la bonne immunisation de chaque protéine/peptide (Procédure 3). 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. Néanmoins, afin de respecter la règle des 3R, c'est à dire de réduire, raffiner et remplacer, différentes démarches seront réalisées.

Le nombre d'animaux utilisés sera au maximum de 3300. Ce nombre de souris est nécessaire pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique.

La procédure numéro 1 contient 450 souris. Pour chaque groupe nous souhaitons utiliser 5 souris, 3 doses, 2 types d'injections pour tester 5 peptides ou protéines (150 souris) \* 3 souches (3 axes) = 450. La procédure numéro 2 contient 450 souris. Pour chaque groupe nous souhaitons utiliser 5 souris, 3 doses, 5 auto-anticorps, 5 sera (150 souris) \* 3 souches (3 axes) = 450. Pour la procédure

numéro 3 pour chaque groupe il y a 4 souris, 2 doses, 2 types d'injections, 10 molécules thérapeutiques afin de tester 5 peptides ou protéines, 5 auto-anticorps et 5 sera. Ce qui fait au total 2400 souris. Il n'est pas nécessaire d'avoir un groupe de souris sans injection de peptide, protéine, auto-anticorps ou sérum, puisque chaque animal sera son propre control à J0 avant l'injection.

Il est important de souligner que dans la procédure numéro 1 et 2 :

Les expérimentations commenceront à partir de l'axe 1 (n = 150), l'axe 2 (n = 150) ne sera réalisé uniquement si l'axe 1 est un échec, de même, l'axe 3 (n = 150) sera réalisé uniquement si l'axe 1 et 2 ne donnent pas pleine satisfaction.

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.

L'utilisation d'un anesthésiant de type isoflurane sera utilisé lors de chaque prélèvement en rétro-orbitale, de chaque injection en sous cutanée/oussinet plantaire ou lors de la mise en place de la pompe en sous-cutanée au niveau dorsal.

L'utilisation d'un analgésiant tel que la lidocaïne au niveau du sinus rétro-orbital avant les prélèvements sanguins, au niveau de la veine de la queue avant les prélèvements, au niveau du coussinet plantaire et au niveau de l'incision dorsale nécessaire à la mise en place de la pompe.

L'utilisation d'un autre analgésiant tel que le buprénorphine sera utilisé avant et après la chirurgie afin d'intégrer la pompe en sous cutanée au niveau dorsale de l'animal.

**19940** Ce projet de recherche porte sur les leucémies (cancer des cellules de la moelle osseuse et du sang) et en particulier sur les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM). Ce type de cancer est couramment traité par chimiothérapie combinant deux molécules : la doxorubicine et la cytarabine. Néanmoins, le mode d'action de ces molécules est encore mal connu. Les connaissances actuelles montrent qu'un certain traitement anti-cancéreux agit sur une protéine présente naturellement dans les cellules normales et dont la fonction est fréquemment affectée dans les leucémies. Nous souhaitons donc déterminer ici si le mécanisme d'action de ces molécules est dépendant de cette protéine. Mieux comprendre comment ces traitements fonctionnent nous permettrait d'identifier les points faibles des cellules cancéreuses et ainsi d'améliorer les traitements actuels et/ou d'en trouver de plus efficaces.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons un modèle de souris développant une maladie semblable aux LAM humaines. Nous avons choisi des souris femelles de 6 à 8 semaines possédant une composition de moelle osseuse proche de celles des patients développant ce type de leucémie, afin d'être dans des conditions comparables aux études préalablement menées dans ce domaine et pouvant être hébergées ensemble sans risque de lutte liée à des comportements de domination. Ce modèle consiste à injecter par voie intraveineuse (injection dans la veine de la queue sur souris éveillées) à des souris normales des cellules leucémiques exprimant ou non la protéine possiblement impliquée dans la réponse thérapeutique. Nous aurons ainsi cinq lots de souris développant des leucémies. Certains groupes d'animaux seront alors nourris avec des granulés contenant un antibiotique, de façon à éteindre l'expression de notre protéine d'intérêt dans les cellules leucémiques spécifiquement. De cette façon, nous pourrons étudier le rôle de cette protéine dans la réponse aux traitements donnés.

Nous suivrons la prolifération des cellules leucémiques avant et/ou après traitement en réalisant un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale. Ces prélèvements seront espacés d'au moins deux semaines s'ils doivent être réalisés sur un même animal. Les souris seront ensuite traitées ou non par les deux molécules d'intérêt (seules ou combinées) administrées par injections soit intra- péritonéales soit intraveineuses quotidiennes pendant maximum 5 jours (les injections étant non douloureuses, elles seront réalisées sur souris éveillées sans analgésie). Les agents thérapeutiques administrés ont déjà fait l'objet d'études antérieures démontrant l'absence de

douleurs associées aux doses utilisées. Les organes contenant des cellules leucémiques comme la moelle osseuse ou encore la rate des souris seront analysés après euthanasie des souris pour évaluer l'effet des traitements dans les deux lots de souris.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

En termes de remplacement, nous avons réalisé au préalable le maximum de tests *in vitro*. Cependant le recours à un modèle animal est maintenant nécessaire afin d'analyser le processus complexe de progression tumorale dans un système physiologique qui tient compte de l'environnement dans lequel ces cellules se développent.

En termes de réduction du nombre d'animaux utilisés, une estimation des effectifs nécessaires pour mener l'étude a été faite en tenant compte de données antérieures, ainsi qu'une simulation statistique afin de garantir l'obtention de résultats statistiquement recevables. Chaque groupe sera donc constitué de 6 souris. Nous utiliserons au maximum 624 souris sur 2 ans que durera le projet, réparties en un groupe contrôle et 3 groupes test (2 molécules thérapeutiques utilisées seules ou combinées). Six temps d'analyse (entre 30 min post-traitement et 7 jours) seront réalisés pour chacun des 5 modèles de souris développant des leucémies.

Nous attacherons une grande importance au bien-être des animaux inclus dans ce projet. En termes de raffinement, les animaux seront hébergés en groupes pour respecter leur comportement naturel. Les animaux seront surveillés quotidiennement, et une grille d'évaluation, tenant compte de leur apparence et de leur comportement notamment, sera tenue chaque semaine de façon à définir des points limites de douleur/souffrance suffisamment précoces pour déclencher le recours à l'euthanasie si ces points limites étaient atteints. Ce suivi clinique sera quotidien lors de la phase de traitement. Aucun antalgique ou analgésique ne peut être administré sans induire un stress oxydant, auquel est très sensible la protéine étudiée. Les procédures n'excéderont pas 3 mois. Les souris seront systématiquement euthanasiées en fin de procédure.

**19941** Contexte scientifique et finalité: Etude de recherche fondamentale sur la capacité des manchots Adélie à faire face aux changements survenant dans l'écosystème marin Antarctique. Recherche également appliquée puisque les résultats servent à l'élaboration de zones de protection dans l'environnement.

Objectif: Le projet s'intéressera aux performances de ces manchots dans la recherche alimentaire en mer sur 5 saisons de reproduction afin d'examiner la réponse des oiseaux à différentes conditions environnementales. Dans le cadre de ce projet, des appareils enregistreurs miniaturisés seront attachés de manière temporaire sur le plumage des oiseaux reproducteurs à leur départ d'un voyage alimentaire en mer. Au retour de l'oiseau, l'appareil sera récupéré, le système d'attache enlevé, et une prise de sang de 2 mL sera réalisée pour mesurer le niveau d'isotope stables de l'azote (pour accéder au régime alimentaire) des manchots.

Remplacer: le but de l'étude est la compréhension de la réponse des manchots Adélie sauvages aux changements environnementaux, il n'est donc pas possible de changer l'espèce.

Réduire: L'effectif total d'oiseaux suivis sur 5 ans est de 500 oiseaux (100 par année, incluant 40 en phase d'incubation et 60 en phase d'élevage du poussin). Ce nombre est un compromis entre faisabilité sur le terrain et effectifs suffisants pour observer des changements significatifs des comportements en lien avec la variabilité individuelle comme nous l'ont montré des études préliminaires sur le sujet par notre équipe et qui utilisaient la même méthodologie. Les tests statistiques que nous utilisons classiquement dans nos études (GLM, GLMM, GAMM) permettent d'inclure un effet aléatoire portant sur l'individu pour permettre de prendre en compte la variabilité interindividuelle.

Raffiner: Nous suivons les consignes données par le Code de Conduite pour l'Utilisation d'Animaux à des fins d'expérimentations animales en Antarctique du Scientific Committee for Antarctic Research. Le temps de manipulation de l'oiseau est limité au maximum (< 10 min), et des précautions sont prises pour diminuer le stress dû à la capture (cagoule masquant la vue, travail

dans une zone calme) et la zone de nidification de l'oiseau est protégée. Les méthodes de suivi par balises sont non invasives et le plumage de l'oiseau est préservé par l'utilisation de scotch marin comme méthode d'attachement. Tout oiseau jugé trop stressé (agitation, début d'hyperthermie, halètements) est immédiatement relâché et surveillé de loin.

**19942** La France est le premier producteur de lait de chèvre dans l'Union Européenne. Face à une demande croissante en produits à base de lait de chèvre, les enjeux majeurs sont d'améliorer le revenu des éleveurs par la recherche d'une plus grande autonomie alimentaire. Le projet Patu Chev fait l'hypothèse qu'une utilisation accrue d'herbe dans les élevages de chèvres répond directement aux exigences d'autonomie alimentaire et économiques, à l'occupation des surfaces et des territoires et au développement de fromages sous signes de qualité. Ce projet vise ainsi à évaluer les conséquences économiques des ajustements techniques visant à améliorer le bilan environnemental et de proposer des produits caprins répondant aux attentes des consommateurs.

Conduire des chèvres au pâturage est une solution technique pertinente au regard de la haute valeur nutritionnelle de l'herbe fraîche, de son faible coût et de la faible empreinte environnementale. Cependant, sa pratique reste faible car elle induit quasi systématiquement une infestation des chèvres par des parasites gastro-intestinaux provoquant de la diarrhée, un affaiblissement très important de l'animal et une baisse de production, en raison de la forte sensibilité de cette espèce. Un dispositif d'évaluation sur le long terme, basé sur une approche systémique, constitue la base conceptuelle de ce projet. Le principe est d'évaluer les réponses de choix techniques mis en place dans un élevage expérimental de taille réduite mais représentatif des élevages commerciaux. Notre étude consiste à évaluer ces choix dans trois systèmes d'élevages qui diffèrent par la période de reproduction des chèvres (printemps ou automne) et le mode de d'utilisation de l'herbe (pâturage et foin ou foin toute l'année). Chaque système étudié sera représenté par un troupeau indépendant. Il y aura ainsi un troupeau avec une période de reproduction à l'automne et pâturant, et deux troupeaux avec une période de reproduction au printemps, l'un pâturant et l'autre alimenté avec du foin toute l'année. Chaque troupeau sera composé au maximum de 64 chèvres en lactation, 25 chevreaux (animaux de moins de 1 an) et 10 boucs. Comme en élevages commerciaux, certains animaux seront amenés à quitter le troupeau pour différentes causes (infertilité, faible croissance, problèmes sanitaires divers). Pour maintenir l'effectif de chaque troupeau sur la durée du projet, chaque année, 25 chevreaux par troupeau, soit 75 chevreaux, seront élevés. L'effectif total d'animaux impliqués sur la durée du projet sera donc de 597 animaux au maximum.

Dans cette étude, au-delà des mesures zootechniques habituelles, 1 prise de sang sera réalisée une fois dans la vie de chaque animal pour conserver son patrimoine génétique. Pour suivre le niveau d'infestation des animaux par des parasites et remédier précocement aux effets néfastes induits, le dénombrement régulier d'œufs de parasites excrétés dans les fèces est la seule technique fiable actuellement. Les fèces sont prélevées directement dans le rectum de l'animal car ce procédé garantit un échantillon sain non souillé. Pour éviter de collecter la totalité des individus, pour chaque troupeau, 3 groupes de 12 individus maximum sont constitués selon la catégorie d'âge (animaux de moins de 1 an, primipares et multipares). Chaque mois, 108 individus maximum seront donc sélectionnés aléatoirement pour constituer un échantillon de fèces moyen. Pour assurer une bonne représentativité au sein de chaque groupe, un même individu ne sera pas collecté plus de 5 fois par an. Si le résultat du groupe indique un niveau élevé, le mois suivant, l'ensemble des animaux du groupe concerné seront collectés pour repérer les individus les plus infestés et administrer un traitement adéquat.

Dans l'optique de supprimer l'utilisation d'hormones pour induire la reproduction et regrouper les mises-bas, 4 prises de sang au maximum par an par animal pourront être réalisées, selon les besoins, pour mesurer i) l'activité sexuelle des boucs par un dosage de testostérone, ii) le suivi de cyclicité des chèvres par le dosage de progestérone, en complément d'un dosage dans le lait quand cela est possible iii) le niveau cortisol avant et après un événement stressant, lié à la conduite. En cas de présence de strongles hématophages, 7 prises de sang au maximum par an par animal permettront de mesurer l'hématocrite.



Les suivis mis en place seront réalisés en prenant en compte la règle des 3R :

- Remplacement : il n'existe pas, à l'heure actuelle de méthode permettant d'éviter ou de remplacer l'utilisation de chèvres pour décrire et évaluer leurs performances et leur état selon la conduite d'élevage étudiée.

- Réduction : le nombre d'animaux dans chaque troupeau a été défini de manière à être représentatif d'un troupeau commercial, tout en le réduisant de moitié par rapport aux références connues (réseau national Inosys). Il n'est pas possible de réduire davantage au risque de ne plus être représentatif de la pyramide des âges présente dans un troupeau de chèvres en lactation et du manque de variabilité individuelle. L'ensemble des données individuelles seront traitées à l'aide d'un modèle mixte à données répétées. Le nombre et la fréquence des collectes de fécès pour le suivi parasitaire a été réduit au minimum nécessaire et suffisant à l'établissement d'un niveau interprétable et d'une réactivité satisfaisante en cas de problème. Les prises de sang pour le stockage de matériel génétique a été réduit à une collecte d'un échantillon de 7 mL dans la vie de l'animal entre l'âge de 6 et 10 mois, ce qui est 33 fois inférieur au seuil recommandé estimé pour un animal de 30 kg en moyenne.

- Raffinement : pour limiter la durée de la collecte et le stress, la contention, les prises de sang et les collectes de fécès seront réalisées systématiquement par un binôme de préleveurs formés et expérimentés où l'un assure la contention de l'animal et l'autre effectue le prélèvement. Pour favoriser la collaboration des animaux, un renforcement positif sera réalisé en distribuant une petite quantité d'aliments au cornadis.

Chez les caprins, les prélèvements sanguins sont réalisables facilement à la veine jugulaire sans nécessité d'anesthésie, car la contention est aisée et que l'animal se laisse facilement faire. La veine jugulaire est massée après chaque prélèvement afin d'éviter tout risque de formation d'hématomes. Dans le cas où un hématome devrait se produire, un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant (Vetebiol®) sera appliqué quotidiennement jusqu'à la disparition de celui-ci. Pour la collecte de fécès, de la paraffine ou un gel spécifique est utilisé systématiquement afin de lubrifier l'anus. Les animaux des systèmes concernés ont accès au pâturage de février à novembre quand les conditions le permettent. Les chèvres, chevrettes et boucs disposent de matériels d'enrichissement de milieu tels que brosses pour tous les lots, promontoires pour les chèvres et chevrettes et balançoire pour les chevrettes.

**19943** La surrénale est une glande paire apposée au-dessus du rein qui joue un rôle important dans l'homéostasie de l'organisme. Le cortex de la surrénale produit des hormones, les minéralocorticoïdes impliqués dans le contrôle de l'équilibre hydrominéral et les glucocorticoïdes, impliqués dans le contrôle du métabolisme et de l'inflammation.

Les Insuffisances Surrénale Primaires (ISP), caractérisées par un défaut d'activité hormonale, sont à l'origine de symptômes spécifiques tels que l'hypoglycémie liée à un déficit en glucocorticoïdes, ou une perte de sel et une déshydratation, liées à un déficit en minéralocorticoïdes. Les ISP peuvent entraîner une insuffisance surrénale aigue, menaçant le pronostic vital en absence de diagnostic et de traitement précoce. Les ISP de l'enfant sont de cause génétique dans 80% des cas. Parmi les causes génétiques, 10% des ISP n'ont pas de cause moléculaire connue. Récemment, une étude préalablement menée au laboratoire a permis de mettre en évidence une mutation inactivatrice du gène LGR4 associée à un phénotype d'insuffisance isolée en minéralocorticoïdes chez l'Homme. Le gène LGR4 est un régulateur positif de la voie de signalisation WNT/b-caténine, qui joue un rôle clé pour la différenciation de la zone glomérulée du cortex surrénalien, responsable de la synthèse des minéralocorticoïdes. Le rôle de ce gène dans l'homéostasie des surrénales n'est pas connu à ce jour. L'objectif de ce projet est donc d'évaluer l'implication du gène LGR4 dans la physiologie de la surrénale, la stéroïdogenèse et dans les causes de l'apparition des ISP.

Dans ce projet, la règle des 3R sera suivie de la façon suivante :

- Remplacer : Une étude *in silico* et *in vitro* sur culture cellulaire sera menée en parallèle. Cependant, puisque les mécanismes physiologiques associés à la différenciation surrénalienne impliquent des

interactions entre différents types cellulaires, l'utilisation d'un modèle de souris est indispensable pour poursuivre ce projet. Nous utiliserons un modèle de souris transgénique dont le gène *Lgr4* sera supprimé de façon tissu-spécifique. Pour cela, deux lignées murines transgéniques déjà disponibles seront croisées entre elles ; une lignée dont le gène *Lgr4* est flanqué de sites *LoxP* qui seront reconnus et coupés par la *Cre* recombinase et une lignée exprimant la *Cre* recombinase sous le contrôle des régions régulatrices de *Sf1*, limitant l'action de cette dernière aux surrénales. Ce croisement permettra donc de supprimer le gène *Lgr4* uniquement dans les surrénales.

- Réduire : Nous analyserons 2 moments clés du développement de la souris ; à un stade « souriceaux », à 5 semaines et à un stade « adulte », à 6 mois de vie. Afin de générer le bon nombre d'animaux pour garantir des résultats fiables, nous générerons 216 animaux, nombre minimum requis pour permettre une approche statistique pertinente pour l'évaluation de nos hypothèses. De plus, l'élevage sera utilisé au mieux puisque nous utiliserons les mâles et les femelles ainsi que la majorité des génotypes générés. Egalement, nous prélèverons à 1 mois et 3 mois, 100µL de sang au niveau de la veine caudale des animaux afin d'évaluer l'évolution du profil hormonal au cours du développement. Les procédures expérimentales et l'analyse des échantillons étant déjà optimisées au laboratoire. Cela nous permettra de limiter les mises au point et par conséquent le nombre d'animaux requis.

- Raffiner : Nous nous assurerons du bien-être des animaux en suivant attentivement l'apparition éventuelle de points limites précoces tels que la perte de poids, l'anémie ou un comportement non approprié pouvant être signe de carences, de domination ou plus généralement de mal-être de l'animal. Les animaux évolueront dans un environnement enrichi, propice à leur développement et leur épanouissement.

Au terme de cette étude, nous aurons caractérisé le rôle du gène *LGR4* dans la mise en place et le renouvellement de la surrénale ainsi que dans la synthèse des hormones stéroïdes. Cette étude nous permettra également de valider l'implication du gène *LGR4* dans les causes de l'apparition des ISP congénitales.

**19944** La maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique sont 2 formes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) comportant des caractéristiques communes. L'étiologie de ces pathologies demeure encore méconnue mais les modèles animaux de ces pathologies suggèrent qu'une combinaison de facteurs génétiques, environnementaux, bactériens et immunitaires y contribue. L'aspect clinique des MICI humaines est hétérogène, un fait qui se reflète également par le nombre sans cesse croissant de modèle murin et de souches transgéniques de souris présentant des altérations intestinales. Les modèles murins de MICI peuvent être utilisés pour étudier les mécanismes physiopathologiques et ils sont des outils précieux pour tester les nouvelles stratégies thérapeutiques en phase préclinique.

Pour cette étude des réponses inflammatoires intestinales deux axes sont considérés:

1. Induction chimique : modèles de colite induit chimiquement par le Dextran Sodium Sulfate (DSS) ou rectocolite induite localement par le 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS)
2. Induction infectieuse : modèle d'inflammation intestinale induit par infection orale par la bactérie *Citrobacter rodentium*.

Ces modèles sont les plus couramment utilisés. Bien qu'ils aient, comme tous les autres modèles, des limites, ils ressemblent, dans certains aspects immunologiques et histopathologiques, aux MICI chez l'homme et seront utilisés dans ce projet pour étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires.

Partie 1 : Ce protocole a pour but d'étudier le rôle de cytokines, récepteurs, ou voies de signalisation impliquées dans la réponse immunitaire de l'hôte dans la colite, à l'aide de souris déficientes pour les gènes correspondants. Les animaux immunodéficients utilisés ne présentent pas de phénotypes dommageables dans les conditions d'hébergement de l'animalerie. Pour déterminer le rôle de certaines populations cellulaires dans les réponses étudiées nous prévoyons d'étudier des animaux issus d'un autre projet, délétés pour certains types de cellules critiques pour la réponse

inflammatoire, ou des animaux chimères après transplantation médullaire afin de déterminer le rôle des cellules hématopoïétiques dans la réponse inflammatoire intestinale.

Partie 2 : Au-delà de la compréhension du rôle précis de ces médiateurs dans la réponse inflammatoire notre objectif est de déterminer de potentielles cibles thérapeutiques, sachant que la modulation de ces cytokines est aujourd'hui une approche très fine et efficace. Donc des nouveaux composés de type anti-inflammatoires seront testés.

Par rapport au précédent projet « Etude des réponses immunitaires impliquées dans la colite chez la souris », l'étude sera élargie à des voies de la réponse immunitaire non encore étudiées dans ce contexte comme les voies de reconnaissance des acides nucléiques, les inflammasomes ou les interférons et leurs récepteurs.

Dans ces modèles d'inflammation intestinale, les animaux vont ressentir une douleur abdominale qui mime les douleurs ressenties par les patients atteints de la maladie de Crohn, pouvant aller jusqu'à l'application du point limite.

Une surveillance quotidienne des animaux est effectuée pendant la période d'acclimatation et d'expérimentation. Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Les animaux seront mis à mort selon la réglementation en vigueur.

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, ainsi qu'avec le microbiote intestinal, aspects qui ne peuvent pas être développés *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : Une anesthésie est réalisée lors de l'administration par voie intrarectale (isoflurane 1-3%). Une surveillance quotidienne des animaux est réalisée. Elle consiste en l'observation de l'aspect général de l'animal, de son comportement, de sa mobilité et de ses fécès, 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 significatifs et reproductibles.

Pour ce projet il est prévu d'étudier 720 souris pour la partie 1 et 720 pour la partie 2, soit 1440 souris au maximum pour 5 ans.

**19945** L'hypersensibilité mécanique ou allodynie (stimulus mécanique léger comme le toucher ressenti comme une douleur) constitue le principal sinon le seul élément mesuré dans les modèles de migraine chez le rongeur. Il constitue le principal symptôme (avec la douleur spontanée) considéré comme le plus invalidant par les patients. 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 sont donc indispensables pour l'amélioration des thérapeutiques. Ce projet a pour ambition d'évaluer l'implication des récepteurs delta opioïdes (DOP) dans deux modèles de migraine chronique. Nous proposons, dans un premier temps, de caractériser l'expression de DOP dans les structures clés de la modulation de la migraine (le noyau caudal du trijumeau (Sp5C) et le ganglion trigéminal (TG)). Ensuite, nous voudrions étudier leur implication dans deux modèles animal (rat) de migraine chronique : 1) modèle ISDN (isosorbide dinitrate), où l'allodynie est déclenchée par administration répétée d'un vasodilatateur, connu chez l'homme pour déclencher la crise de migraine ; 2) modèle SI (soupe inflammatoire), où la crise migraineuse est déclenchée par

l'administration répétée de substances inflammatoires au niveau des méninges. Les deux modèles sont nécessaires car la migraine est une maladie multifactorielle.

Dans le respect de la règle des 3R : (1) remplacer : il est nécessaire de réaliser ces études *in vivo*, car l'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique. Aucune méthode alternative ne permet de remplacer ce protocole ; (2) réduire et raffiner : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum 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 6/8 en tenant compte la complexité de ce type de manipulation et aussi du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 15-20 % de rats doivent être écartés de l'étude (échec de la chirurgie, canule bouchée, non-répondeurs). Ainsi, nous utiliserons 12 groupes (N=6-8/groupe\*2 sexes ; Total= 184 rats adultes de la souche Sprague-Dawley).

Sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et de l'environnement), les animaux auront accès à l'eau et à la nourriture ad libitum. 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 et que le stimulus est d'une durée très courte (douleur évoquée d'intensité faible à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Suite à la craniotomie (chirurgie d'implantation de la canule), les rats recevront un traitement pré et post-opératoire au kétoprofène pendant 3 jours (5mg/kg en intramusculaire). Lors des sessions d'injections répétées (soit d'ISDN, soit de SI), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie... mettrait fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique.

Par ce projet, nous entendons caractériser l'expression de DOP chez le rat et comprendre l'implication dans la migraine chronique.

**19946** La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie neurologique caractérisée par la perte des motoneurones, une neuro-inflammation et la paralysie de la musculature squelettique, avec une survie potentielle de 3 à 5 ans après le diagnostic. À ce jour, nous ne disposons pas de traitement de la maladie.

L'origine génétique de la SLA a été documentée chez environ 10% des patients, dont ceux qui présentent des mutations du gène de l'enzyme superoxyde dismutase. Par ailleurs, des études précliniques suggèrent que de multiples mutations dans le gène codant pour la SOD1 contribuent à l'augmentation de la neuro-inflammation dans la SLA. D'autre part, il est à signaler qu'une sous-population de cellules du sang périphérique, les lymphocytes T régulateurs, peuvent jouer un rôle dans la progression de la neuro-inflammation, et par conséquent, dans l'évolution de la SLA. À cet égard, nous visons à étudier la possibilité d'une implication du thymus (organe lymphoïde primaire, capable de générer des lymphocytes T) dans le relargage et fonction des lymphocytes régulateurs chez la souris transgéniques SOD1, portant la SLA.

Les résultats atteints pour ce projet pourront révéler des nouvelles pistes de traitement pour améliorer la qualité de vie des patients porteur d'ALS.

Pour ce projet un total de 148 animaux sera nécessaire. Nous utiliserons des souris transgéniques SOD1G93A à différents moments de la vie postnatale: 30, 60 et 120 jours, correspondant à la période précédent (J30, J60) et suivant (J120) l'apparition des signes cliniques de la maladie. Tous les animaux seront euthanasiés avant chaque expérience sous anesthésie profonde avec de la xylazine et de la kétamine, conduisant à une mort indolore.

Ce projet respectera le principe des 3R :

Remplacement : La mise au point d'un modèle *in vitro* de co-cultures prévu dans ce projet pourrait à terme permettre de diminuer significativement les besoins en animaux pour des études ultérieures.

Réduction : La composition des groupes d'études a été faite pour utiliser un nombre minimal d'animaux (8 animaux par sexe et par génotype - voir même  $n=5/\text{sexe}/\text{génotype}$  pour l'expérience la moins soumise à variabilité) en suivant les recommandations du document « working with ALS mice » publication de référence pour la réalisation d'expérience sur cette souche.

L'utilisation de mâles est de femelles, pour obtenir un nombre d'animaux suffisamment important pour être statistiquement représentatif, permet d'utiliser l'ensemble des animaux générés par nos accouplements limitant ainsi d'autant le nombre de portées nécessaire.

Les animaux transgéniques non SOD serviront de contrôle WT ainsi une commande d'animaux WT spécifique ne sera pas nécessaire et autant d'animaux n'auront pas à être euthanasiés inutilement. De plus nous réaliserons plusieurs analyses sur les mêmes animaux (comme par exemple des analyses de sang et de tissus), ainsi nous réduisons de façon significative le nombre de souris nécessaire et par conséquent le double emploi.

Raffinement : Ces animaux seront regroupés par groupe de 4 pour les mâles et par groupe de 5 pour les femelles au maximum. Dans chaque cage un enrichissement sera apporté sous forme de papier kraft pour la confection des nids, voir avec des abris en carton si besoin. Enfin chaque animal sera suivi quotidiennement de sa naissance à sa mort. Pour minimiser le stress des animaux, ceux-ci seront manipulés tout au long du projet par un nombre limité de personne pour créer une habitude souris/manipulateur. Il est à noter qu'un soin particulier sera apporté aux animaux commençant à développer la maladie pour leur faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau. Ainsi des croquettes ou de la bouillie pourront être placés directement dans la cage ainsi que de l'hydrogel en cas de besoin. Une anesthésie profonde, sans réveil possible, sera réalisée le jour de l'euthanasie des animaux, seul jour où les procédures opératoires seront réalisées sur ceux-ci, afin de réduire toute douleur occasionnée par notre expérimentation. Aucune douleur post-opératoire n'est à envisager. Tout au long de la vie des animaux un suivi rigoureux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être. Tout animal présentant des signes de souffrance (agression dans la cage ou comportement anormal par exemple) sera traité de la manière la plus optimale possible (désinfection, analgésie ou sacrifice en cas de besoin) afin de limiter au maximal toute souffrance.

**19947** La chair de poisson est une source avantageuse d'acides aminés, d'acide gras insaturés et de vitamines liposolubles. Malheureusement, l'allergie aux poissons est une des plus fréquentes rencontrées dans le monde et tend regrettablement à se répandre. Les stratégies immuno-thérapeutiques de désensibilisation aux allergènes pisciaires sont peu efficaces. Il y a donc un véritable problème de santé publique portant sur une source alimentaire de première importance : le poisson. La protéine parvalbumine beta1 est l'allergène majeur des salmonidés. Notre projet vise à examiner si des modifications du gène parvalbumine beta1 chez la truite supprimerait l'allergénicité de sa chair. Pour ce faire nous recourrons aux outils moléculaires de modifications des génomes pour d'une part invalider le gène et d'autre part, sans invalider le gène, provoquer la délétion ciblée de la séquence codant le peptide allergénique. Des tests *in vitro* réalisés dans un cadre collaboratif permettront de vérifier chez des patients sensibles l'absence d'allergénicité du muscle de truites dont le gène parvalbumine a été modifié.

Il s'agira concrètement de faire produire des œufs chez des truites femelles sexuellement matures. Puis d'injecter les outils moléculaires appropriés dans les œufs fraîchement fécondés au stade une cellule (zygote). Les larves qui en dériveront feront l'objet d'un génotypage. Enfin, des croisements seront réalisés afin d'établir 3 lignées F2 distinctes présentant l'homozygotie pour la mutation. Les tests d'allergénicité porteront sur les 3 lignées F2.

Remplacer : Notre étude porte sur le phénotypage (en particulier l'allergénicité) de muscle de truites dont le gène parvalbumine est modifié par génie génétique. Il faut donc considérer un organisme entier d'où est tiré le muscle qui servira pour les tests évoqués plus haut

Réduire : les effectifs (femelles sexuellement matures, embryons injectés et alevins génotypés) sont réduits au maximum pour obtenir 5 lignées F2 distinctes (large délétion, mutation ponctuelle invalidante et délétions de la séquence codant le peptide allergène). Ainsi nous utiliserons seulement 4 femelles ovulantes dont chacune servira à l'obtention de trois pontes successives. De

plus nous comptons limiter le pool de sauvegarde des F0 mutants à partir duquel seront générés les lignés F2 à seulement une vingtaine d'individus sélectionnés.

Raffiner : Les animaux seront toujours élevés dans les conditions optimales pour l'espèce (photopériode, qualité d'eau, densité et alimentation). Le prélèvement des œufs se fera selon une procédure établie et approuvée (ci-jointe). Si des animaux (F0, F1 ou F2) devaient présenter une anomalie morphologique ou comportementale alors ils seraient immédiatement sacrifiés selon les procédures d'euthanasie en vigueur.

**19948** Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) regroupent la maladie de Crohn, pouvant concerner tout le tube digestif, et la rectocolite hémorragique (ou colite ulcéreuse), limitée aux régions du rectum et du côlon. Ces maladies se traduisent par des douleurs abdominales, des diarrhées, une perte de poids et du sang dans les selles, symptômes affectant grandement la qualité de vie des patients.

D'un point de vue expérimental, un des modèles d'inflammation intestinale couramment utilisé est l'induction d'une inflammation du côlon chez le rat.

Ce modèle tend à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant les maladies, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Il permettra d'évaluer les propriétés anti-inflammatoires de nouvelles molécules provenant de l'industrie pharmaceutique majoritairement. Les études d'efficacité anti-inflammatoire sont exclusivement réalisées chez le rat, offrant des mesures robustes et reproductibles sur la base de modèles parfaitement décrits, calibrés et admis par la communauté scientifique.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Le raffinement est mis en place autant que possible pour éviter la souffrance et le stress des animaux (anesthésie lors de l'injection intra-rectale de TNBS, surveillance des animaux tous les jours). Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Dans le cadre de ce projet, une estimation montre que le nombre d'animaux qui seront utilisés pour la totalité du projet (2 ans) est de au maximum 300 rats répartis sur 6 études.

**19949** Nous sommes constamment exposés à des produits chimiques qui peuvent influencer notre santé. Certains sont des perturbateurs endocriniens qui interfèrent avec le système hormonal, comme le retardateur de flammes TBBPA (tétrabromobisphénol A). Il est largement utilisé surtout dans les produits électroniques, mais ses effets sur la santé humaine ne sont pas bien connus. Des expériences chez le poisson-zèbre et sur des cellules de mammifères ont montré que le TBBPA perturbe le fonctionnement des tissus adipeux et peut être un initiateur de l'obésité, ce qui n'est pas montré chez les mammifères. L'exposition périnatale au TBBPA entraîne un dysfonctionnement des hormones thyroïdiennes, hormones clés de la régulation du métabolisme. L'obésité peut donner lieu à un phénomène d'inflammation et conduire à la neurodégénérescence. Cependant, les taux de TBBPA mesurés dans les tissus humains sont faibles et n'induisent sans doute pas d'effet direct sur le métabolisme. Notre hypothèse est qu'une exposition durant la période périnatale (période de vulnérabilité accrue du fait de la mise en place des axes de régulation), pourrait modifier la capacité de gérer à l'âge adulte un déséquilibre métabolique induit par une nourriture trop riche en graisses et en glucides (nourriture « occidentale »). Tout le monde n'a pas les mêmes capacités métaboliques: on qualifie de métabolisme flexible la capacité d'adapter le métabolisme oxydatif aux substrats disponibles, et de pouvoir utiliser indépendamment les graisses ou les sucres afin d'en tirer l'énergie nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme. Cette capacité évite l'accumulation de graisses dans les tissus ainsi que les dysfonctionnements pouvant conduire aux pathologies métaboliques regroupées sous le terme « syndrome métabolique ». Nous cherchons à comprendre

les effets néfastes d'une exposition périnatale au TBBPA sur la réponse métabolique et inflammatoire à une alimentation occidentale à l'âge adulte. Nous vérifierons l'hypothèse qu'une exposition périnatale au TBBPA augmente la neuroinflammation induite par le régime occidental et que la capacité de flexibilité métabolique protège des effets néfastes de cette exposition associée à un régime occidental. Pour comprendre les mécanismes sous-tendant ces régulations, nous comparerons deux souches de souris, l'une possédant un métabolisme flexible (résistante à l'obésité induite par un régime gras), et l'autre développant une obésité sous ce même régime. Ces travaux apporteront une meilleure compréhension des mécanismes de dérégulation métabolique par les perturbateurs endocriniens pendant le développement et clarifieront le rôle protecteur de la flexibilité métabolique. On utilisera trois groupes expérimentaux: a) contrôle b) régime occidental c) exposition périnatale au TBBPA via la prise alimentaire (10 mg/kg par jour, de la dernière semaine de gestation jusqu'à 3 semaines après la mise-bas) suivi par régime occidental à l'âge adulte. La dose est en dessous de la NOAEL (No Observable Adverse Effect Level, 40 mg/kg/jour) du TBBPA mais assez élevée, pour que les souriceaux soient exposés via leurs mères. On suivra le développement du phénotype métabolique des souriceaux à 2, 4 et 6 mois par 1) caméra thermique (thermogenèse), 2) test densitométrique (analyse corporelle), 3) test de tolérance au glucose et 4) prélèvements de sang pour étudier les hormones métaboliques. A 6 mois, nous mesurerons l'impact des traitements sur les fonctions cognitives (test de mémoire spatiale). Les souris seront ensuite sacrifiées (prélèvement sang et tissus afin d'étudier l'inflammation, le métabolisme et la neurodégénérescence). Pour les femelles, le métabolisme étant impacté par les hormones sexuelles, elles seront utilisées à la même phase de cycle oestrien (metoestrus, vérifié par frottis). Afin d'obtenir un nombre suffisant de nouveau-nés de chaque sexe pour des résultats statistiquement exploitables, nous utiliserons 27 souris gestantes de la souche sensible à l'obésité (portées de 7-8 petits) et 45 souris gestantes de la souche résistante à l'obésité (portée de 3-4 petits), pour obtenir 144 souriceaux pour chaque souche ( $n=8/\text{groupe} \times 12 \text{ groupes} (3 \text{ groupes expérimentaux} \times 2 \text{ souches} \times 2 \text{ sexes}) \times 3 \text{ répétitions sur 5 ans}$ ). Chaque groupe sera constitué de petits provenant d'au moins deux portées pour chaque étude afin d'éviter un effet « portée » entre les groupes qui pourrait fausser les résultats. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 360 (72 femelles et 288 souriceaux utilisés pour les expériences). Selon les données publiées la dose de 10 mg/kg/jour ne devrait pas entraîner d'effets néfastes quand appliquée seule, et le régime occidental ne devrait pas avoir d'autres effets sur la santé des souris que ceux recherchés. L'application de la règle des 3R sera respectée : Réduire : l'utilisation de chaque animal sera optimisée, afin d'acquérir un maximum de données par animal et réduire ainsi le nombre d'animaux traités. Cependant pour effectuer toutes les expériences on a besoin de 24 souris/groupe/souche (12 âgées de 6 mois pour l'étude de comportement et 6 pour les âges de 2 et 4 mois), obtenues grâce aux 3 répétitions de 8 souris/groupe. Le nombre d'animaux nécessaires par groupe a été estimé en tenant compte de la variabilité biologique interindividuelle afin d'obtenir des résultats permettant des tests statistiques avec assez de puissance. Raffiner : le milieu d'hébergement des animaux sera enrichi (matériel de nidification, igloo, bâtonnets du bois à ronger). Nous veillerons au bien-être des animaux et à leur intégrité physique (suivi du poids, aspect des poils, signes comportementaux de souffrance ou de stress, application des points limites). Les animaux mâles doivent être hébergés individuellement pour éviter les bagarres : pour pouvoir comparer les résultats, les mêmes conditions d'hébergement seront appliquées aux femelles. Les prélèvements seront réalisés par une personne expérimentée et le volume prélevé sera au maximum 15% de volume total du sang. Remplacer : ces études physiologiques portant sur des influences métaboliques et inflammatoires des perturbateurs endocriniens ne peuvent être réalisées que chez des animaux vivants, dans un système intégré.

**19950** L'immunociblage avec des anticorps monoclonaux est une option thérapeutique qui a émergé il y a une trentaine d'année. Actuellement plus de 100 anticorps médicaments sont sur le marché (dont la moitié est utilisée dans le cancer), et de nombreux anticorps sont en essai clinique en oncologie thérapeutique.

Les cancers du sein nécessitent de nouveaux traitements. La technologie que nous sommes en train de mettre en place a pour grand objectif le développement d'anticorps innovants pour proposer de nouvelles thérapies ciblées et des alternatives thérapeutiques dans le traitement des cancers du sein.

Les anticorps humains utilisés dans ce projet ciblent deux protéines anormalement présentes dans le microenvironnement des cancers du sein qui présentent des activités pro-tumorale et pro-métastatique : il s'agit de la protéase cathepsine D et de la protéine SPARC.

Les objectifs globaux de ce projet pour les 5 années concerneront l'analyse détaillée des efficacités thérapeutiques et des mécanismes d'action, impliquant en particulier les cellules du système immunitaire, d'anticorps monoclonaux humains ciblant cathepsine D et SPARC.

Pour ce projet, nous proposons de greffer des souris femelles immunocompétentes (BALB/c et C57BL/6) avec des lignées cellulaires murines de cancer du sein (TUBO et EO771). Les traitements par les anticorps seront administrés en monothérapie puis en combinaison avec des traitements de chimiothérapie ou d'immunothérapie. Ces modèles de souris syngéniques sont les mieux adaptés pour étudier l'impact de nouveaux médicaments dans la pathologie cancéreuse mammaire en particulier en ce qui concerne les réponses immunitaires antitumorales.

Le plan expérimental a été conçu pour chacune des deux cibles (cathepsine D et SPARC) en prenant en compte la règle des 3R.

-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 rentrant en jeu dans les réponses aux traitements avec des anticorps ou de la chimiothérapie.

-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 réduire le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences avec les souris. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum tout en ayant un nombre suffisant pour obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux risquerait d'engendrer des résultats trop variables et non valides.

-Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les points limites ont été établis dans la procédure expérimentale et le suivi clinique des animaux se fera sur la base de la fiche de scoring établie par la SBEA. Les souris seront surveillées quotidiennement y compris les week-ends et jours fériés et ceci dans le but de suivre le développement de la tumeur, celle-ci ne devant pas excéder 10% du poids normal de l'animal, et détecter le moindre signe de souffrance et/ou de détresse de l'animal. L'hébergement est modifié par enrichissement du milieu et le nombre d'animaux par cage sera limité.

Pour l'ensemble du projet nous avons prévu un nombre total d'animaux maximal de 1382 animaux:

-BALB/c de 702 au maximum (et de 498 au minimum) pour une durée de 5 ans, ce qui correspond à environ 140 souris BALB/c par an.

-C57BL/6 de 680 au maximum (et de 482 au minimum) pour une durée de 5 ans, ce qui correspond à environ 136 souris C57BL/6 par an.

Ces souris sont immunocompétentes et elles constituent donc le meilleur modèle pour étudier l'impact des traitements sur les cellules du système immunitaire.

**19951** L'espérance de vie des patients atteints des formes les plus agressives de gliomes, des tumeurs primaires du système nerveux central, va de quelques mois (enfants) à 2 ans (adultes). Aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour.

La présence de cellules aux propriétés variées au sein des tumeurs cérébrales les plus agressives est un des problèmes à surmonter pour traiter ces cancers. Cette hétérogénéité cellulaire est associée à des adaptations du métabolisme qui correspond à l'ensemble des réactions chimiques



nécessaires au fonctionnement cellulaire. Mais le métabolisme se révèle être plus qu'un simple support. Il peut aussi être un des moteurs de la genèse de l'hétérogénéité intra-tumorale et expliquer la résistance aux traitements actuels. Le métabolisme apparaît donc comme une nouvelle cible thérapeutique prometteuse. Les produits du métabolisme sont en effet d'un intérêt thérapeutique évident ; les enzymes qui les produisent sont des cibles de choix pour les manipulations pharmacologiques et certaines des molécules identifiées peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique et ont déjà été utilisées en thérapeutique humaine.

Notre but est d'obtenir une carte des voies métaboliques actives dans les tumeurs des patients, ceci en lien avec les divers états de fonctionnement des cellules. Pour y parvenir, nous partons de l'analyse de la tumeur des patients pour identifier les cibles les plus prometteuses et vérifions leur implication dans le contrôle des propriétés des cellules à l'aide de modèles *in vitro*. Cette démarche permet de circonscrire le nombre de candidats à tester dans les modèles *in vivo*. En effet, si les modèles *in vitro* permettent d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, ils ne permettent pas le remplacement des modèles *in vivo*, seuls à offrir la possibilité d'aborder toute la complexité de la dynamique de l'évolution tumorale telle qu'elle prend place chez les patients. Le meilleur modèle *in vivo* de gliomes de haut grade établi à ce jour est constitué par la greffe dans le cerveau de souris de cellules isolées à partir des résections chirurgicales des tumeurs des patients. Ces greffes aboutissent à des tumeurs qui conservent les anomalies génomiques et les aspects histologiques de la tumeur du patient. La validité de ce modèle est toutefois limitée par l'utilisation imposée de souris immunodéficientes, puisque qu'il s'agit de greffer des cellules humaines dans un tissu murin. Il doit donc être complété par un modèle syngénique dans lequel des cellules de gliomes murins sont greffées chez des souris au système immunitaire intact. La combinaison de ces deux modèles et l'utilisation d'un nombre suffisant d'animaux pour évaluer statistiquement les résultats, permet l'obtention de données fiables sur l'implication des voies moléculaires étudiées dans le contrôle du développement des gliomes et sur l'efficacité thérapeutique des molécules testées. Ce schéma expérimental renforce la pertinence translationnelle de la démarche tout en tenant compte de la règle des 3R, notamment les principes de « remplacement » et « réduction ». Le suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence permet également d'éviter l'euthanasie d'animaux à des temps intermédiaires pour vérifier la cinétique de croissance tumorale et donc la réduction du nombre d'individus. Le développement de systèmes d'expression conditionnelle *in vivo*, l'inclusion de tests de toxicité systémique sur un nombre réduit de souris préalables à la mise en œuvre des expériences, ainsi que la prise en compte d'un taux de succès expérimental de 80% et du nombre minimal requis pour une analyse statistique s'inscrivent également dans les principes de réduction et raffinement. Le principe de raffinement est également pris en compte en terme de bien-être des animaux grâce à l'enrichissement de leur habitat avec des matériaux pour la construction de nids, la surveillance quotidienne de leur comportement et l'adoption de points limites visant à éviter la souffrance de l'animal, et l'utilisation d'anesthésiques pour toutes les procédures expérimentales.

A l'aide de ces modèles, notre projet vise à évaluer *in vivo* dans des situations au plus proches de la complexité originelle de la tumeur des patients le rôle de différents enzymes du métabolisme et de leurs produits sur l'initiation de la tumeur et sa croissance. Pour y parvenir 36 expériences sont prévues impliquant un total de 468 souris adultes femelles. Elles permettront de tester le rôle de 6 enzymes distincts et d'évaluer les effets de l'administration des métabolites correspondants sur la croissance tumorale.

**19952** 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 1880 souris (réparties dans 5 modèles différents) 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.

**19953** Le cancer du rein est la cause de plus de 140.00 décès par an dans le monde. L'incidence et la prévalence augmente. Le principal type de cancer du rein est le carcinome rénal (RCC). Dans le cas d'un RCC métastatique, la survie à 5 ans est inférieure à 10% chez l'homme.

Le RCC étant résistant aux chimiothérapies standards, les traitements classiques sont la chirurgie ainsi que des agents anti-angiogéniques (luttant contre la formation de vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux sanguins pré-existants) ou immunothérapeutiques. Ces thérapies ont des réponses variables, et, sans biomarqueurs moléculaires (marqueurs biologiques à l'échelle moléculaire) utilisables en clinique, une prédiction précise de l'évolution de la maladie, de l'issue du patient, et de l'efficacité du traitement est difficile.

La physiopathologie du RCC est toujours très peu connue, et il y a un besoin clair d'identifier des mécanismes clefs de la progression tumorale et métastatique (formation de tumeurs secondaires issues de l'extraction de cellules de la tumeur primaire) afin d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Dans des travaux précédents, nous avons identifiés des gènes dont l'expression est dérégulée dans des cellules tumorales murines issues de tumeurs primaire et de métastases, et dont l'expression corrélait avec la survie des patients humains. Dans le but de comprendre les rôles de ces cibles et de mettre en évidence leurs intérêts thérapeutiques potentiels, nous générons des cellules tumorales surexprimant ces gènes et souhaitons analyser leurs rôles dans un modèle *in vivo* murin. Les travaux précédents étant basés sur le même modèle murin, nous pouvons utiliser notre recul pour limiter le nombre d'animaux utilisés sans compromettre la fiabilité statistique de nos résultats.

Le projet se place dans le cadre d'un projet de plus vaste faisant intervenir des bioinformaticiens, des mathématiciens et des biologistes.

Bien que nous testions au maximum nos hypothèses d'abord *in vitro* (mortalité, prolifération, migration ...), certains aspects ne sont hélas pas aujourd'hui abordables *ex vivo*. C'est la raison pour laquelle des études sur les animaux nous sont obligatoires. Afin de mener à bien ce projet, nous tablons sur l'utilisation de 1500 animaux (souris) sur 5 ans. Nous tablons sur une utilisation moyenne de 300 animaux par ans, ce qui permet aux tumeurs de se développer, et nous permet d'effectuer les analyses de l'expérience en aval. Afin de limiter le nombre d'animaux, nous utilisons des techniques d'imagerie afin de suivre l'évolution de la maladie, ce qui permet de ne pas avoir à sacrifier les animaux afin de suivre le développement. Les expériences menées seront construites afin de pouvoir recueillir le maximum de données et d'échantillons biologiques. C'est la raison pour laquelle nous recueillerons par exemple le sang, les tumeurs et autres organes d'intérêt (poumons, reins sains), lors du sacrifice des animaux. Afin de mimer les protocoles thérapeutiques chez l'homme, des résections de tumeurs pourront être mises en œuvre, de même que des traitements. De plus, les animaux sont suivis de façon journalière par le personnel de l'animalerie ainsi que par les membres de l'équipe scientifique en charge du projet. Les animaux sont hébergés dans des cages comprenant une nourriture adaptée est enrichi par des tunnels en polycarbonate ou polysulfone. La prise en charge de la douleur chez les animaux pendant l'opération est assurée par des antalgiques contenus dans l'anesthésique (xylazine/kétamine). La douleur post-opératoire est prise en charge par une injection de buprénorphine lors de l'opération, soutenue par une seconde injection dans les 48h suivant l'opération si des signes de douleur sont décelés.

**19954** Nos projets de recherche sont axés autour de la compréhension des mécanismes de signalisation impliqués dans l'activation des lymphocytes T. Grâce à la forte structuration de notre équipe autour d'un axe de recherche interdisciplinaire, nous analysons notamment la dynamique des protéines et lipides membranaires et cytosoliques dans des cellules vivantes, par des mesures biophysiques et une imagerie de pointe. Notre recherche est plus spécifiquement articulée autour de deux questions majeures concernant :

- l'élucidation des bases moléculaires du déclenchement initial de la réponse après engagement du TCR (T cell receptor) par les complexes peptide-MHC (pMHC). Nous chercherons à évaluer comment la dynamique moléculaire à la membrane plasmique participe à la régulation de l'activation lymphocytaire.

- la compréhension moléculaire des mécanismes par lequel les cellules T intègrent des signaux d'activations perçus de façon fractionnée dans le temps et les convertissent en activation fonctionnelle.

Si nous effectuons les étapes de mise au point de protocoles expérimentaux sur des lignées cellulaires lymphocytaires, les altérations génétiques de ces cellules immortalisées nous obligent à travailler sur des lymphocytes T primaires de souris pour réaliser nos projets. Il s'agira d'animaux génétiquement modifiés qui expriment des récepteurs à l'antigène spécifiques (knock-in) et/ou dont les lymphocytes T portent des déficiences pour des gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (knock-out conditionnels). Dans tous les cas, ces modifications génétiques n'induisent pas de phénotype délétère. Les analyses que nous pratiquerons sur nos souris génétiquement modifiées sont des analyses fonctionnelles de leurs cellules immunitaires basées sur des approches *in vitro*, sur cellules primaires explantées. Elles consisteront principalement à faire un état des lieux complet du fonctionnement de leurs lymphocytes T *in vitro*.

L'hébergement des animaux est effectué en confinement adapté à la stabulation de lignées de souris (cages à couvercles filtrants) et les animaux sont manipulés en condition stérile. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Les conditions d'hébergement ont été optimisées pour réduire le stress des animaux : présence d'enrichissement dans les cages (dômes et/ou coton), et maintien des animaux en groupes de 4 à 6 afin d'éviter le stress de l'isolement.

Notre projet intègre les notions et exigences de remplacement, réduction et raffinement. - Remplacement : dès que c'est possible, nous remplacerons l'utilisation de cellules primaires par

l'utilisation de lignée cellulaire immortalisées, notamment pour les mises au point expérimentales. - Réduction : Pour chaque procédure expérimentale, seulement le nombre minimal de souris nécessaire à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé, soit 1800 animaux en tout dans ce projet, - Raffinement : Aucun phénotype délétère n'est attendu dans ce projet. Néanmoins, un suivi quotidien des souris sera réalisé et des points limites sont définis afin de prendre des mesures évitant toute souffrances éventuelles.

**19955** Cas9 (CRISPR associated protein 9) est une enzyme spécialisée qui coupe l'ADN à un endroit précis. La correction des gènes mutés à l'aide de CRISPR-Cas9 est une stratégie thérapeutique prometteuse dans les maladies génétiques. Le transfert réussi de CRISPR-Cas9 a déjà été montré dans des cellules de l'oreille interne de souris *in vivo*.

Nous voulons appliquer cette stratégie à la rétine afin d'augmenter l'efficacité et la sécurité de la correction de gènes dans des maladies rétinienne héréditaires.

Notre stratégie consiste en l'injection intraoculaire du complexe CRISPR-Cas9 afin de corriger précisément une mutation donnée.

Cette thérapie génique sera testée sur deux modèles murins (souris) de rétinite pigmentaire après des mises au point technique sur des souris normales.

Au total 390 souris seront nécessaires en incluant les contrôles.

Nous avons préalablement mené des études et des tests d'optimisation de notre système sur des cellules rétinienne de souris *in vitro*. Le modèle expérimental *in vivo* est cependant indispensable pour mener à bien notre étude car aucun système *in vitro* ne peut prédire l'efficacité *in vivo* des complexes testés. Des premières études sur des souris normales ont été effectuées et ont permis de présélectionner une catégorie de vecteurs très prometteurs.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse) pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

Le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et 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 ».

Remplacement: les injections dans la rétines nécessaires pour cette étude ne permettent pas de remplacer l'utilisation des animaux par des méthodes *in vitro*.

Réduction : nous avons réduit au maximum le pool des animaux utilisés pour atteindre l'objectif scientifique fixé dans ce projet pour cela nous utiliserons le test ANOVA mono-paramétrique.

Raffinement : Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. Pour veiller au bien être de l'animal l'utilisation d'anesthésie sera utiliser dès que nécessaire

**19956** Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est l'un des cancers les plus fréquents avec une incidence croissante dans les pays développés. C'est la 5ème cause de cancer dans le monde et la 3ème cause de mortalité par cancer. L'obésité et l'excès de tissu adipeux (tissu gras) contribuent à une réponse inflammatoire chronique, qui semble jouer un rôle majeur dans le développement du CHC. Le pronostic vital est extrêmement faible, faute de traitements efficaces. Il a été récemment montré que certaines protéines libérées par les cellules et les organes (foie, graisse) pouvaient avoir un impact sur l'appétit et être un stimulateur lipogénique chez la souris, c'est-à-dire entraîner une formation de gras. L'inhibition ou la destruction de ces protéines, chez la souris, induisent une perte de poids et une réduction de la consommation alimentaire. Sur la base de ces observations, nous déterminerons si l'inhibition de cette protéine peut prévenir les CHC 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 des CHC. Réduction : Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes normales et transgéniques (nombre totale d'animaux = 2700). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales se révèlent négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. 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. 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...). 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 efforcerons 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.

**19957** Les inhibiteurs de cycline/CDK de la famille Cip/Kip p27 et p57 sont connus pour leur rôle d'inhibiteurs de la prolifération cellulaire. Ce rôle leur confère des propriétés de suppresseurs de tumeurs et la perte de l'expression de ces protéines est fréquemment observée dans de nombreux cancers chez l'homme.

Cependant, ces protéines ont également d'autres fonctions et sont impliquées dans le contrôle de divers processus cellulaires. Afin d'étudier ces nouvelles fonctions et leur importance *in vivo*, nous travaillons avec des lignées de souris soit invalidées pour p27 ou p57, soit qui expriment des mutants de p27 ou p57 qui inactivent uniquement la fonction d'inhibiteur de cycline/CDK mais laissent les autres fonctions intactes.

p57 joue un rôle critique au cours du développement embryonnaire et l'invalidation de p57 résulte en un phénotype de létalité périnatale. p57 est impliqué dans le développement du syndrome de Beckwith-Wiedemann chez l'homme, une maladie rare caractérisée par de nombreux défauts au cours du développement. p57 est un gène soumis à l'empreinte parentale et seul l'allèle maternel est exprimé. De ce fait les individus héritant un allèle muté de leur mère ont un phénotype similaire aux mutants homozygotes.

A l'inverse, p27 joue un rôle crucial dans le contrôle de la prolifération chez l'adulte. L'invalidation de p27 chez la souris donne un phénotype de gigantisme, où les individus sont environ 30% plus grands que les individus sauvages, causé par une hyperprolifération dans tous les tissus. La perte de p27 cause également l'apparition de tumeurs au niveau de l'hypophyse vers 12 mois. Ces souris sont également plus susceptibles à la tumorigénèse induite par des carcinogènes. Les femelles homozygotes mutantes pour p27 sont stériles.

Du fait de la létalité périnatale (p57) et de la stérilité des femelles (p27), ces lignées doivent être maintenues à l'état hétérozygote.

1. Role de p57 dans le contrôle du destin des cellules souches intestinales et de la tumorigénèse intestinale.

Nous avons découvert un rôle crucial de p57 dans le développement intestinal. Une partie du projet est l'étude des rôles de p57 dans le contrôle de la prolifération et du destin des cellules souches

intestinales au cours du développement, en conditions normales chez l'adulte, et au cours la tumorigénèse intestinale.

Pour ces études, nos souris sont croisées avec des souris permettant de suivre les cellules souches intestinales et/ou leur descendance. Toutes les études mécanistiques sont réalisées sur cellules (lignées ou cultures d'organoïdes) pour minimiser le nombre d'individus requis.

- Pour l'étude du rôle de p57 dans le développement intestinal, les intestins sont collectés à E18.5 (avant la naissance) après mise à mort des embryons. Il n'y a aucun traitement.

- Pour l'étude des cellules souches intestinales en conditions normales chez l'adulte, p57 sera invalidé dans les cellules souches intestinales (deux injections intrapéritonéales de tamoxifène) puis les individus seront mis à mort entre 3 et 30 jours après injection de tamoxifène. Procédure #1 - 120 animaux.

- Pour l'étude du rôle de p57 dans la tumorigénèse intestinale, p57 sera invalidé dans les cellules souches intestinales (deux injections intrapéritonéales de tamoxifène). Elles sont ensuite soumises soit :

- à un protocole de tumorigénèse intestinale chimique (Azoxymethane, 2 injections intrapéritonéales, et Dextrane sulfate dans l'eau de boisson). Procédure #2 - 60 animaux.

- à une tumorigénèse génétique par co-invalidation du suppresseur de tumeur APC qui induit la formation de polypes intestinaux. Dans ce cas les souris n'ont pas d'autre traitement. Procédure #3 - 80 animaux.

Pour les deux protocoles de tumorigénèse intestinale, les souris seront mises à mort soit 10 j, soit 10 semaines après traitement tamoxifène.

2. Rôle de p27 dans la régulation des cellules souches pulmonaires et de la tumorigénèse pulmonaire.

Nous avons découvert que p27 contrôle la prolifération des cellules souches pulmonaires et que les souris exprimant un mutant de p27 sont plus susceptibles à la tumorigénèse pulmonaire. Pour déterminer si les cellules souches pulmonaires sont à l'origine des tumeurs, nos souris mutantes pour p27 seront croisées avec des souris permettant de suivre les cellules souches pulmonaires et/ou leur descendance.

- Les cellules souches pulmonaires seront suivies (une injection intrapéritonéale de tamoxifène) dans les souris p27 mutantes pendant plusieurs mois pour déterminer comment p27 affecte ces cellules en conditions normales. Procédure #4 - 120 animaux.

- La tumorigénèse pulmonaire sera induite par traitement uréthane (une injection intrapéritonéale), qui provoque la formation d'adénomes, et un suivi des cellules souches sera effectué (une injection intrapéritonéale de tamoxifène). Procédure #5 - 60 animaux.

Des cellules dérivées de nos souris mutantes pour p27 (fibroblastes ou organoïdes pulmonaires) seront utilisées pour toutes les expériences mécanistiques et de biologie cellulaire.

Pour respecter les règles des 3R, nous cherchons :

#### 1. A Réduire

- En optimisant le nombre d'individus et de cages en permanence et à choisir les génotypes des individus que nous croisons pour réduire le nombre de naissances inutiles pour nos expériences.

- A maximiser le nombre de tissus collectés sur chaque individu mis à mort afin de limiter le nombre de souris nécessaires.

#### 2. A Raffiner

- Le fond génétique des souris utilisées est choisi en fonction des expériences afin de maximiser les phénotypes observables et donc leur interprétation et robustesse.

- Tous les animaux sont systématiquement hébergés dans des cages qui comporte un enrichissement afin d'augmenter leur bien-être.

-Tous les protocoles utilisés sont éprouvés, ce qui permet de déterminer la durée des protocoles de manière à obtenir les meilleurs résultats possible tout en respectant le bien-être animal et en minimisant la souffrance.

-A respecter des points limites précoces : tout signe de souffrance ou perte de poids marquée entrainera la mise à mort de l'individu concerne afin d'éviter la souffrance.

### 3. A Remplacer

-Dans le but d'éviter d'utiliser des animaux, lorsque nos expériences le permettent, nous les réalisons sur des fibroblastes embryonnaires de souris (MEFs) en culture ou d'autres types de cellules primaires (par exemple poumon, intestin). Si possible, nous utilisons aussi pour nos expériences de caractérisation moléculaire, des lignées cellulaires que nous transfectons avec les gènes d'intérêt.

-Lorsqu'une lignée n'est plus utilisée, elle est congelée.

**19958** Le diabète de type 2 (DT2) se caractérise notamment par une hyperinsulinémie, une hyperglycémie (à jeun et au cours du repas) et une insulino-résistance, paramètres fortement délétères pour l'organisme. Récemment, il a été démontré que le duodénum (= partie la plus haute de l'intestin) est considéré comme cible potentielle pour traiter le DT2. En effet, chez le patient diabétique, le duodénum se contracte de façon anormale (= hyper-contractilité) ce qui favorise une augmentation trop importante de l'absorption du glucose dans l'organisme, générant une hyperglycémie après le repas. De plus, le cerveau (et plus particulièrement une région centrale, l'hypothalamus) interprète mal cette hyper-contractilité pathologique (qu'il détecte via des messages nerveux afférents provenant du duodénum). Ensuite, il envoie à son tour des messages nerveux aberrants vers les autres tissus (muscles, foie, tissu adipeux), aboutissant à une insulino-résistance.

Dès lors, il est crucial de proposer une stratégie thérapeutique permettant de ralentir les contractions duodénales pour diminuer l'absorption du glucose et restaurer un message normal entre l'intestin et le cerveau. Les neurones présents dans l'intestin consistent le Système Nerveux Entérique (SNE), et sont les principaux acteurs cellulaires contrôlant la motilité duodénale. Ainsi, il a été identifié différentes molécules d'origines variées (nutriments, neurotransmetteurs, hormones...) et synthétisées par le microbiote et/ou l'hôte, permettant de cibler les neurones du SNE pour ralentir l'hyper-motilité duodénale. L'ensemble de ces molécules ciblant le SNE est regroupé sous le terme "entérosynes".

En plus du DT2, il existe une pathologie, la maladie de Hirschsprung, qui se caractérise par une altération du SNE dans les parties distales de l'intestin dès la naissance des bébés. En effet, ces enfants présentent à la naissance une constipation sévère, nécessitant l'ablation chirurgicale d'une partie du colon. Cette ablation permet un retablisement quasi normal de l'élimination des fèces, mais à l'âge adulte, certains de ces enfants développent une hyper-motilité duodénale associée à un DT2. Pour rappel, les patients diabétiques (non-Hirschsprung) présentent aussi une hyper-motricité duodénale et ont toujours leur colon. Dès lors, le duodénum est une cible privilégiée pour traiter l'hyper-motricité génératrice du DT2.

Ainsi, notre objectif est de développer un modèle murin de la pathologie de Hirschsprung afin d'identifier de nouvelles entérosynes permettant d'améliorer la qualité de vie des patients diabétiques (non-Hirschsprung) et/ou souffrant de la maladie de Hirschsprung et du DT2. Avec un seul modèle animal, nous identifierons de nouvelles cibles thérapeutiques pour 2 pathologies ayant des caractéristiques communes.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1012 souris à raison de 44 souris par expérience (1 groupe de 20 "Contrôle": 10 sous régime normal et 10 sous régime gras, 1 groupe de 24 "Hirschsprung": 12 sous régime normal et 12 sous régime gras), minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. La règle des 3R sera appliquée pour ce projet. Pour ce modèle, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps par des techniques non invasives comme le suivi du poids et la consistance des fèces. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information

devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, des enrichissements seront rajoutés aux animaux tels que des aspen Brick, des tunnels en polycarbonate ou des igloos. Une étude rétrospective sera effectuée à la fin de chaque expérience pour déterminer les possibilités de diminution du nombre d'animaux et/ou d'amélioration des procédures pour diminuer la souffrance animale. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement. Une veille bibliographique sera effectuée pour déterminer si des méthodes de remplacement ont été mise en place. Pour chaque procédure des points limites ont été définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal et l'animal sera euthanasié s'il présente un de ces points limites d'arrêt de la procédure. De plus, les personnes responsables du projet ont été formées à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques ; elles garantissent de la formation et de l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales. L'apprentissage et la maîtrise des gestes techniques sont reportés dans les livrets de compétences des personnes concernées. Pour toutes les procédures nécessitant de la chirurgie, les animaux seront anesthésiés et surveillés jusqu'à leur réveil, un suivi et une observation post-opératoire sera mise en place.

**19959** L'éthanolamine (EA) est un composé retrouvé en quantité non négligeable dans le tractus gastro-intestinal, provenant notamment des membranes phospholipidiques de cellules épithéliales desquamées. De nombreuses études *in vitro* ont montré que certaines entérobactéries du microbiote intestinal telles qu'*Escherichia coli* peuvent cataboliser l'EA si elles possèdent un opéron composé de 17 gènes codant les enzymes et protéines accessoires nécessaires à sa dégradation. Dans le cadre d'un projet mené au laboratoire qui vise à caractériser les capacités cataboliques d'une collection de souches commensales d'*E. coli*, nous avons identifié plusieurs isolats capables d'utiliser l'EA *in vitro* en tant que source de carbone et d'azote. Il s'agit désormais d'évaluer si ces souches utilisent également l'EA en condition physiologique, à savoir dans le tractus gastro-intestinal et si cette utilisation impacte le fitness d'*E. coli* et donc sa capacité à se maintenir dans l'intestin. L'identification et la caractérisation de telles souches commensales pourraient par la suite permettre d'envisager de nouveaux moyens de lutte contre certaines infections intestinales. En effet, il est clairement établi que l'EA constitue un avantage nutritionnel pour différentes bactéries pathogènes intestinales favorisant leur développement au cours du processus infectieux. La présence de bactéries commensales utilisant l'EA pourrait constituer un élément participant à l'effet barrière du microbiote à travers des phénomènes de compétition nutritionnelle.

Nous utiliserons des souris comme modèle d'étude et estimons que 80 individus seront nécessaires pour mener à bien cette étude sur 2 ans. En accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE, les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) seront les suivantes :

- « Remplacer » les modèles animaux: Les études *in vitro* en condition de laboratoire ont d'ores et déjà été effectuées et ont permis de valider l'utilisation d'EA *in vitro* par certains isolats d'*E. coli* commensaux. Il est cependant important de valider cette utilisation dans l'écosystème naturel d'*E. coli*, à savoir le tractus digestif. Par ailleurs, il est indispensable d'avoir recours aux animaux pour observer ce phénotype dans un organisme entier afin de prendre en compte la complexité du système qui intègre à la fois la structure du tractus digestif, la présence du microbiote intestinal et l'ensemble des métabolites et conditions physico-chimiques associés. Il n'existe pas de modèles cellulaires reproduisant la complexité de ces interactions.

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation : Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux différentes questions scientifiques à la fois pour garder une puissance statistique suffisante dans le traitement de nos résultats, et pour pallier l'exclusion de certains animaux au cours de l'expérimentation. Il s'agit d'un nombre maximal d'animaux qui sera revu à la baisse en fonction des premiers résultats obtenus qui pourront dans certains cas ne pas nécessiter de répétitions pour valider les observations.



- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites justifiant la sortie d'animaux au cours du protocole expérimental. L'ensemble des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel qualifié afin d'identifier l'apparition de signes éventuels de souffrance. Si les points limites tels que définis dans le projet sont atteints, les animaux seront immédiatement sortis du protocole expérimental et euthanasiés selon la réglementation en vigueur.

**19960** Notre capacité à mesurer l'activité neuronale *in vivo* permet d'améliorer considérablement notre compréhension du cerveau. Un nouveau système d'imagerie ultra miniaturisé et portatif nous permet aujourd'hui de visualiser l'activité de centaines de neurones individuellement pendant la réalisation d'une tâche comportementale chez la souris.

L'objectif de cette étude est dans un premier temps la mise en place et la validation d'un protocole avec ce système pour l'observation de l'activité neuronale dans une zone du cerveau (le cortex infralimbique, CIL) de souris en utilisant un indicateur calcique apporté par injection d'un vecteur viral. Ces protocoles, une fois validés par ce premier volet, serviront de base à la seconde étape consistant à étudier les mécanismes sous-jacents.

Dans ce premier volet, 40 souris adultes (mâles et femelles) maximum seront utilisées. En effet dès que les procédés (expression de l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) seront réalisés avec succès de manière répétée (4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies), la technique sera considérée comme acquise et validée, et l'exploration des mécanismes pourra commencer.

La technique ayant déjà été mise en place précédemment pour une région différente dans le laboratoire, nous sommes confiants de pouvoir passer relativement rapidement au second volet qui consiste en l'étude des mécanismes neuronaux d'une nouvelle approche thérapeutique pour le stress post-traumatique, les stimulations crâniennes ultrasonores répétées (rTUS).

L'État de Stress Post-Traumatique (ESPT ou PTSD, pour Post-Traumatic Stress Disorder, APA 1994) est une pathologie psychiatrique qui touche 8 à 12% de la population générale et qui se caractérise par un ensemble de symptômes qui surviennent après l'expérience d'un événement traumatique comme un attentat par exemple. Ce traumatisme va provoquer une réaction de peur intense, un sentiment d'impuissance ou d'horreur. La symptomatologie du PTSD apparaît au bout de quelques mois, et se caractérise par un syndrome de reviviscence traumatique, des stratégies d'évitement, un émoussement affectif et une activation neurovégétative. De manière importante, le PTSD affecte différemment les personnes selon le sexe : les femmes sont en général plus touchées, certaines études rapportant jusqu'à deux fois plus de chance pour une femme de développer cette maladie. Il est donc capital de prendre le facteur du sexe des individus en compte lors de l'élaboration de nouveaux protocoles thérapeutiques, afin de pouvoir identifier et cibler de potentielles différences dans la réponse au traitement.

L'efficacité des thérapies pharmacologiques (antidépresseurs) ou psycho-cognitives reste cependant limitée. L'amélioration de l'arsenal thérapeutique dans le traitement du PTSD représente donc un enjeu de santé publique majeur. Ces dernières années, les techniques de neurostimulation ont émergé comme nouvelles options de traitement. Au laboratoire, nous avons mis au point le traitement par rTUS du CIL dans le traitement de la dépression et sommes en train de faire de même pour le PTSD. C'est une technique qui offre l'avantage d'être non-invasive mais dont l'efficacité à long terme et les mécanismes sous-jacents demeurent inconnus.

Dans un second temps, nous étudierons donc l'efficacité et l'impact à long terme d'une stimulation rTUS du CIL dans le traitement du PTSD à travers l'analyse de l'activité neuronale à l'échelle cellulaire. Pour cette expérience, 120 souris réparties en 4 lots expérimentaux de 30 souris, mâles et femelles en proportions égales par groupe, soit un total de 160 souris pour les deux phases.

Raffinement : les populations neuronales ciblées par cette méthode sont très spécifiques. Les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes). Les interventions chirurgicales se feront sous anesthésie générale par des chercheurs formés et expérimentés. Les animaux

recevront un traitement analgésique avant l'intervention, un traitement anti-inflammatoire après l'intervention et 24 heures après. Si nécessaire un traitement antibiotique sera administré. 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.

Le modèle de PTSD appliqué aux animaux peut être qualifié d'intensité moyenne, en raison de sa brièveté. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension et la contention des souris, et sont soucieux d'éviter tout stress inutile lors de la réalisation des procédures. Pendant la stimulation rTUS, les animaux sont sous anesthésie gazeuse, ils sont placés sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie et leurs cornées sont protégées de la déshydratation par un gel.

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée.

Réduction : Lors du premier volet de mise en place de la technique, 40 souris (mâles et femelles) maximum seront utilisées pour la phase de test. Les effectifs sont optimisés pour la mise en place d'un nouveau protocole (pas de test statistique). En effet dès que le procédé (expression du l'indicateur calcique, implantation et enregistrement de l'activité neuronal) sera réalisé avec réussite de manière répétée (critère: 4 enregistrements successifs réussis dans chacune des stratégies et au moins 6 souris enregistrées par stratégie), le procédé et la technique seront considérés comme acquis et validés et nous passerons à la phase suivante sans utiliser la totalité de 40 souris. Les animaux seront commandés progressivement par lots de 5 à 10, afin d'éviter que certains animaux ne soient pas utilisés.

Pour la seconde partie d'étude des mécanismes, les effectifs sont optimisés, les observations comportementales corrélées à l'activité comportementale nécessitent une taille d'effectifs suffisante compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=30 sujets par groupe mâles et femelles, en considérant également le taux de succès des chirurgies estimé de 40 à 50%).

**19961** Les maladies cardiovasculaires sont une des causes majeures de morbi-mortalité dans le monde. Parmi les nombreux facteurs de risque, les dyslipidémies sont identifiées comme étant principalement à l'origine des pathologies vasculaires. Les dyslipidémies sont caractérisées par des anomalies qualitatives ou quantitatives d'un ou de plusieurs lipides circulants : cholestérol total, HDL-cholestérol, LDL-cholestérol et triglycérides.

L'objectif de ce projet est d'identifier de nouvelles voies thérapeutiques et d'évaluer l'effet de molécules pharmacologiques innovantes visant à améliorer le métabolisme lipidique et les bénéfices vis à vis des complications cardiovasculaires sous-jacentes.

Dans le cadre de la recherche sur les dyslipidémies, les études *in vitro* et les études *in vivo* sont deux approches complémentaires. Les modèles développés *in vitro* utilisent des cellules ou des organites cellulaires d'origine animale et humaine qui permettent de sélectionner l'efficacité d'un « candidat » par rapport à la cible visée. Ces modèles confortent les hypothèses de cohérence entre le candidat et sa cible, et permettent de sélectionner les composés qui présentent la meilleure efficacité. L'évaluation du bénéfice thérapeutique des composés pharmacologiques préalablement sélectionnés *in vitro* et destinés au traitement des dyslipidémies et de leurs conséquences cardiovasculaires nécessite une approche *in vivo* intégrée et pertinente, permise par le recours à l'animal.

Les modèles *in vivo* seront développés chez la souris et le hamster. Les modèles mis en place chez le hamster sont des modèles particulièrement adaptés à l'étude de la synthèse et la dégradation des lipoprotéines car cette espèce possède un métabolisme et un profil lipidique plus proche de celui de l'Homme que d'autres espèces d'animaux de laboratoire. Par ailleurs, le métabolisme globalement plus rapide chez la souris permet de raccourcir le temps des périodes expérimentales. Les modèles murins permettant de se rapprocher de la physiopathologie cardiaque humaine nécessitent d'augmenter l'expression des cibles cardiométaboliques d'intérêt avant d'évaluer le

bénéfice thérapeutique de leur atteinte par les composés. Ainsi, nous prévoyons d'administrer des protéines recombinantes humaines chez la souris en vue d'étudier le potentiel thérapeutique des composés pharmacologiques.

Remplacement :

Le métabolisme des lipoprotéines reste néanmoins un processus complexe qui implique les fonctions hépatiques mais aussi les autres tissus utilisateurs des lipides comme le tissu adipeux et les muscles. La multiplicité des acteurs cellulaires et l'origine multifactorielle des dyslipidémies n'est donc pas reproductible ou modélisable *in vitro*. Le recours à des modèles *in vivo* est fortement recommandé.

Mise en oeuvre des 3R :

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. Ne seront administrées aux animaux que des modèles d'intérêt sélectionnés à partir de filtres *in vitro*, *in silico* etc...donc en moins grand nombre de molécules et donc moins d'animaux utilisés.

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 générale ou topique est pratiquée et des points limites sont mis en place dans les études pour limiter la souffrance des rongeurs.

Les manipulateurs sont formés et validés dans leur gestes ce qui réduit les manipulations douloureuses.

Le nombre de rongeurs utilisé dans le cadre de ce projet est au maximum de 480 souris et 400 hamsters (soit 880 rongeurs) sur 5 ans.

**19962** Les maladies neurodégénératives liées à la protéine PRION représentent un réel problème à la fois en santé animale et en santé humaine. En élevage, elles sont responsables de la tremblante chez les ovins, la scrapie chez les caprins, ou la vache folle ou ESB (Encéphalopathie Spongiforme Bovine) chez les bovins. Les animaux atteints présentent des symptômes sévères et il n'existe aucun traitement. En santé humaine, il a été démontré un franchissement de la barrière d'espèce de l'agent pathogène PRION, au moins de l'espèce bovine vers l'espèce humaine. Cet agent pathogène PRION est unique, c'est un repliement anormal de la protéine PRION endogène (codée par le gène PRNP) qui porte la pathogénicité. Mal repliée, la protéine PRION s'accumule dans le cerveau et entraîne la neuro dégénérescence.

Depuis les années 1990, période pendant laquelle la crise de la vache folle a considérablement fait évoluer nos connaissances et nos approches concernant ces maladies, une sélection accrue de variant (versions possibles d'un même gène) de moindre sensibilité, dits de résistance, du gène PRNP a été menée dans les espèces ovines et caprines (un variant de résistance code une version de la protéine PRION qui limite, sans abolir, la virulence de la protéine). Si cette sélection a porté ses fruits dans l'espèce ovine où plusieurs allèles de résistance sont présents, il n'en est pas de même dans l'espèce caprine où les rares allèles de résistance sont minoritaires dans la population. Une solution alternative et radicale pour éviter l'apparition des maladies à PRION consiste à sélectionner des animaux dépourvus de cette protéine PRION, suite à des mutations du gène PRNP conduisant à un arrêt de production de cette protéine par l'organisme mutant.

Une mutation naturelle du gène PRNP est survenue dans la population caprine norvégienne où elle a été décrite pour la première fois en 2012. Cette mutation fait disparaître la protéine PRION chez les animaux porteurs des deux copies mutantes du gène (animaux homozygotes PRNP-/-). Depuis 2012, une équipe de chercheurs norvégiens caractérise cette mutation et les effets de l'absence de

la protéine PRION dans la population caprine norvégienne. Parmi leurs résultats les plus significatifs, ils ont pu montrer que les animaux dépourvus de la protéine PRION (i) sont résistants aux Prions ; (ii) ont une immunité différente de celle des animaux possédant la protéine ; et, (iii) présentent une dégénérescence accrue des fibres nerveuses au cours du vieillissement.

Le projet que nous proposons est inscrit dans un projet européen qui débutera en Juin 2021. Dans ce vaste projet visant à améliorer la sélection génétique des ruminants, il est prévu de comparer (via un exemple pratique, objet de la présente demande) l'efficacité de l'introduction d'un caractère (l'absence de protéine PRION) par deux voies différentes. L'une utilise la technique d'élevage classique (nommée : introgression) de croisements entre deux races de chèvre : celle possédant le caractère (Norvégienne = race donneuse), vers l'autre ne le possédant pas (Alpine = race receveuse). L'autre voie va utiliser les nouvelles technologies de modifications ciblées des génomes (« genome editing », GE) afin de reproduire la même mutation « Norvégienne » directement dans le génome des chèvres de race Alpine. La technique d'introgression se déroule sur plusieurs années (minimum 5) afin d'éliminer, du génome de la race receveuse (Alpine), les parties non désirées du génome de la race donneuse (Norvégienne) ; c'est-à-dire tout le génome sauf la mutation ceci afin de préserver au maximum les autres caractères de la race receveuse. En réalité cela n'arrive jamais puisqu'au moins les parties adjacentes du génome de la race donneuse (régions génétiquement liées à la mutation) resteront dans le génome de la race receveuse. La technique de GE permet, au contraire de la technique d'introgression, de reproduire la mutation désirée, et elle seule, dans le génome de la race « cible » (Alpine) en seulement une ou deux générations. Le maintien par croisements naturels des deux lignées de chèvres (1) PRNP KOint (introgression) et (2) PRNP KOGE fait l'objet de la présente demande.

Le projet, visant à comparer les deux méthodes (introgression et GE) d'introduction d'une mutation d'une race à une autre (dans la même espèce), nécessite donc l'utilisation d'animaux. Par ailleurs, il est impossible de remplacer les animaux pour étudier les effets de la perte d'un gène. En effet, un gène peut intervenir dans plusieurs fonctions biologiques et il est impossible de reconstituer simultanément *in vitro* ces multiples fonctions. La première lignée PRNP KOint sera maintenue dans un bâtiment d'élevage conventionnel dans deux enclos délimités pour la lignée. La deuxième lignée PRNP KOGE sera maintenue dans un bâtiment d'élevage agréé pour recevoir des animaux génétiquement modifiés, également dans deux enclos délimités pour la lignée. Une vingtaine d'animaux seront présents annuellement pour chacune des lignées (ceci pour une durée totale de 4 ans et demi). Le nombre total de 180 animaux a été réduit au maximum conformément à la règle des 3Rs. Les animaux seront hébergés par lot d'une dizaine pour favoriser les relations sociales. Ils auront accès à l'eau et à du fourrage sec sans limitation. Un enrichissement du milieu sera proposé. Une surveillance quotidienne des animaux sera effectuée par les responsables du bien-être animal. 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.

**19963** La douleur est un problème de santé publique très important. Les douleurs chroniques, qu'elles soient neuropathiques ou inflammatoires, touchent plus de 5 millions de personnes en France et sont persistantes et rebelles aux traitements usuels. La prise en charge de ces douleurs constitue une priorité de santé publique mais reste difficile.

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 neuropathique et un modèle de douleur inflammatoire afin de mettre en évidence le rôle de notre gène cible dans les mécanismes douloureux et d'identifier de nouvelles molécules candidats médicaments pour traiter la douleur chronique. Nos analyses *in vitro* précédentes démontrent que ce gène est exprimé dans des neurones sensoriels nociceptifs responsables de la perception de la douleur. Ces résultats

préliminaires suggèrent que ce gène est potentiellement impliqué dans les mécanismes de la douleur. Nous souhaitons à présent évaluer avec une étude fonctionnelle *in vivo* son rôle potentiel dans la mise en place et le maintien de la douleur neuropathique et/ou inflammatoire chez la souris. Les modèles de douleurs neuropathiques et de douleurs inflammatoires seront utilisés sur des souris sauvages et mutantes pour notre gène cible. La sensibilité des animaux sera évaluée à l'aide d'outils classiques pour mesurer la sensibilité mécanique afin d'identifier de quelle manière intervient ce gène.

Par ailleurs, la motricité (tests : Rotarod, Catwalk), la sensibilité au chaud et au froid (tests : Cold and Hot plate), la force musculaire (Grid test), la sensibilité mécanique (test de von Frey), l'anxiété et la dépression (test : Openfield) des souris sauvages et mutantes pour notre gène cible seront évaluées.

Il est prévu d'utiliser 192 souris pour ce projet.

Les groupes testés seront des animaux :

- sauvages en condition naïve (contrôle), de douleur neuropathique et de douleur inflammatoire
- mutants pour notre gène cible en condition naïve, de douleur neuropathique et de douleur inflammatoire.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Remplacer : 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 notre gène cible. Nous sommes en train de développer un modèle *in vitro* de cellules souches humaines différenciées en neurones pour mieux comprendre le fonctionnement de notre gène cible 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.

- Réduire : le nombre de souris utilisé 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. Le nombre d'animaux par lot est basé sur la littérature où un effet statistiquement significatif est mis en évidence à partir d'un seuil de 10 animaux par lot. De plus, un calcul de puissance via le logiciel G power permet de définir 11 animaux par groupe avec un  $\beta = 80\%$  pour une différence de 50% entre les groupes contrôles et mutants. Nous avons donc choisi par sécurité de constituer des lots de 12 animaux.

- Raffiner : pour limiter l'angoisse due aux tests pratiqués, une acclimatation est réalisée durant laquelle les animaux à leur arrivée sont laissés 5 jours dans les cages pour qu'ils s'habituent aux locaux de notre animalerie. Durant une semaine, les animaux sont ensuite manipulés et présentés aux appareils de tests comportementaux mais aucun test n'est pratiqué afin que les animaux s'habituent à l'expérimentateur ainsi qu'aux différents équipements de test. Cette étape d'habituation permet aux animaux de s'habituer à l'environnement, à l'expérimentateur et de limiter le stress lié à la procédure.

Ce projet porte sur la douleur, par conséquent, l'utilisation des médicaments anti-douleur suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrite. Cependant, le temps d'expérimentation est réduit au strict nécessaire afin de limiter la souffrance des animaux dans le temps.

Les animaux seront anesthésiés par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (induction 4-5%, maintien 1,5-2%) pendant la chirurgie et les injections. Ils seront réchauffés par une lampe rouge pendant la phase de réveil puis ils seront regroupés et isolés des animaux non opérés ou non injectés afin de limiter les combats. Une surveillance post-opératoire et post-injection sera assurée par l'expérimentateur et les zootechniciens. Les animaux seront ensuite observés quotidiennement au cours de l'expérimentation et nous utiliserons une grille de score d'évaluation de la douleur et/ou souffrance pour évaluer l'état général et la douleur des animaux. Différents paramètres sont observés tels que l'apparence, l'alimentation, le comportement naturel et la respiration.

La douleur étant le paramètre étudié aucune médication antalgique ou analgésique systématique ne sera appliquée. Si la douleur s'avère trop intense et donc les points limites atteints (perte de poids >20%, vocalisations spontanées, automutilation, animal agité ou immobile et détresse respiratoire, saccadée) les animaux sont euthanasiés (Euthasol VET, pentobarbital sodique à 400mg/ml; 2 ml/kg pour les souris injectées en intrapéritonéal) sans délai afin d'éviter la mort par inanition.

En cas de blessures dues à des combats entre les animaux, ceux-ci seront séparés et les plaies désinfectées et soignées.

Les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress, d'augmenter la productivité ainsi que la survie des animaux pendant l'élevage. Ce milieu est constitué d'un igloo dans les cages de reproduction pour procurer un sentiment de sécurité à l'animal, du coton dans toutes les cages pour la nidation, du papier cartonné pour stimuler les instincts naturels de nidification et de jeu et des copeaux de pin pour réchauffer les souris en cas d'hypothermie.

**19964** La myostatine est un régulateur négatif de la croissance musculaire. La surexpression de cette protéine engendre une diminution de la masse musculaire. Elle agit après avoir été sécrétée dans la circulation sanguine en se fixant à des récepteurs à la surface des cellules musculaires. Limiter l'action de la myostatine présente une voie thérapeutique très prometteuse pour les maladies de dégénérescence musculaire progressive. Des essais chez l'animal et de premières études cliniques chez l'homme ont montré l'intérêt de trois molécules pour inhiber son action. Ces trois inhibiteurs vont se fixer à la myostatine dans le sang et empêcher sa propre fixation sur les récepteurs à la surface des cellules musculaires. Bien qu'aucun traitement mettant en jeu l'un de ces inhibiteurs ne soit encore autorisé sur le plan clinique, ils sont déjà produits et vendus au marché noir par différents fournisseurs spécialisés dans la musculation et visant les sportifs. Ces produits sont bien évidemment interdits par l'Agence Mondiale Antidopage. Le laboratoire antidopage français a mis en place une méthode de détection de ces produits *in vitro* mais n'a pas pu valider cette approche *in vivo*, ces produits étant non autorisés chez l'homme. L'objectif de cette étude pilote consiste à reproduire chez le rat un protocole d'administration similaire à celui qui serait utilisé par les sportifs d'après les blogs de musculation (injection du produit une fois par jour pendant plusieurs jours d'affilée dans le muscle d'intérêt) pour évaluer si la détection de ces produits est possible *in vivo* et pour combien de temps. Trois doses seront injectées puis l'élimination du produit sera suivie pendant 3 autres jours. Le but sera d'évaluer la capacité de détection de ces produits *in vivo* dans le sang et l'urine des rats en utilisant les méthodes mises au point. Cette étude nécessite l'utilisation de rongeurs car il n'est pas possible d'évaluer *in vitro* comment réagissent les produits après administration (dégradation/élimination): cela nécessite un organisme vivant. Le rat est le plus approprié car ces produits restent non autorisés chez l'homme. 24 rats sont nécessaires pour valider la fenêtre de détection de chacun des trois produits (durée de détection possible dans le sang et l'urine après injection du produit) en prenant en compte une variabilité interindividuelle et un groupe contrôle. A chaque temps étudié, la réponse sera soit positive (si l'identification est possible) soit négative (produit indétectable). Les animaux seront d'abord habitués à leur environnement, puis ils recevront les injections des produits sous anesthésie. Bien que les produits ne présentent pas de risque connu d'effets secondaires à court terme, ils seront surveillés quotidiennement et retiré du protocole en cas de perte de poids, blessure ou prostration. Ils seront euthanasiés à la fin de l'étude. Les résultats serviront à aider à la mise en place d'une surveillance des inhibiteurs de myostatine dans le cadre de la lutte antidopage chez l'homme.

**19965** Les anticorps thérapeutiques ont révolutionné la prise en charge de pathologies telles que le cancer et les maladies inflammatoires.

Dans ce projet, l'objectif est de développer de nouveaux formats d'anticorps basés sur les nanocorps (nanocorps-Fc). En effet, les nanocorps, qui sont produits naturellement par les

camélidés, possèdent des caractéristiques uniques qui offrent de nouvelles perspectives thérapeutiques.

L'évaluation des nanocorps-Fc se déroulera selon 2 stratégies. La première se basera sur des vecteurs de thérapie génique de type AAV (virus adéno-associé). Cette stratégie a pour intérêt majeur de n'avoir recours qu'à une seule injection et non à des injections répétées, limitant grandement les manipulations des souris. Cette méthodologie, particulièrement adaptée à l'évaluation simultanée de plusieurs nanocorps-Fc, permettra d'identifier et de sélectionner les meilleurs nanocorps-Fc candidats. L'efficacité de ces nanocorps-Fc sélectionnés sera ensuite évaluée dans des modèles de cancer.

La seconde stratégie permettra de valider l'aspect translationnel du projet. Elle reposera sur l'administration répétée par voie intrapéritonéale des nanocorps-Fc sélectionnés précédemment afin de mimer un schéma thérapeutique tel que rencontré chez l'homme.

La durée du projet est de 5 ans. Les expérimentations envisagées reposent sur l'utilisation de souris d'élevage. Les groupes expérimentaux comprennent 4 à 7 animaux par groupe afin de pallier aux variabilités inhérentes à ce type de modèles expérimentaux et de permettre une analyse statistique fiable. En fonction des résultats générés, le nombre minimal de souris d'élevage utilisé dans cette étude est estimé à 292, le nombre maximal à 740.

L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R :

- RAFFINEMENT : Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée. Pour la limiter, nous avons établi une grille d'observation visant à définir des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée. Un analgésique (buprénorphine 0,05 mg/kg par voie sous-cutanée) dès l'apparition des premiers signes de douleur. Un enrichissement du milieu est également apporté par des abris de cellulose et des carrés de coton vierge.

- REDUCTION : Une étude approfondie de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de l'absence de résultats publiés s'approchant des objectifs de notre étude. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences sera établi de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs.

- REMPLACEMENT : Il n'existe actuellement pas de modèle *in vitro* permettant d'évaluer les interactions entre les cellules du système immunitaire et les cellules tumorales. Ainsi, la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique a recours à un modèle animal.

**19966** La gale, dermatose parasitaire contagieuse, peut-être à l'origine de foyers épidémiques difficiles à maîtriser, en particulier dans les collectivités. Bien que cette parasitose demeure un problème majeur de santé publique dans le monde avec plus de 300 millions de personnes parasitées, elle a été très peu étudiée. Le mode de transmission reste également mal connu.

Les traitements utilisés en France chez l'Homme sont soit des topiques à base de pyréthrine, de benzoate de benzyle ou de crotamiton soit de l'ivermectine par voie orale. Chez l'animal, la gale est également un problème préoccupant. L'arsenal thérapeutique en médecine vétérinaire est plus vaste et certaines molécules utilisées chez l'animal pourraient représenter de nouvelles alternatives chez l'Homme.

Nous proposons d'utiliser un modèle animal qui ne peut être remplacé par une approche ex-vivo en raison des interactions entre l'immunité locale, la nature des lésions et l'action des molécules testées. De plus, le sarcopte ne peut pas proliférer ou être maintenu longtemps en dehors de son hôte. Aucune mise en culture n'est donc possible pour une analyse *in vitro*. Il est également très difficile de le prélever en grande quantité et de l'étudier *in vitro*. Le modèle animal ne peut donc pas être remplacé à l'heure actuelle.

Le premier objectif sera de mettre en place et de maintenir le modèle expérimental sur un faible nombre de porcs (3 porcs renouvelés tous les 6 mois) à partir de données d'autres équipes ayant déjà utilisé ce modèle avec succès. Le second objectif sera d'évaluer plusieurs molécules anti-parasitaires d'intérêt, leur pharmacocinétique cutanée et le temps nécessaire pour contrôler la maladie et sa contagiosité. L'objectif global de notre projet est de permettre par la suite des essais

thérapeutiques chez l'Homme après une évaluation d'efficacité et de tolérance grâce au modèle expérimental porcin de gale sarcoptique.

Pour chaque essai de molécule (second objectif), 12 porcs seront infestés avec la gale à partir de prélèvements faits sur les 3 porcs utilisés pour le maintien du modèle expérimental. Sur ces 12 porcs, 4 porcs constitueront un lot contrôle (pas de traitement), 4 porcs constitueront un lot témoin positif (traitement avec l'ivermectine comme traitement de référence) et 4 porcs constitueront un lot test (traitement avec la nouvelle molécule test).

Tous les porcs, que ce soit les 3 porcs utilisés pour le maintien du modèle ou les 12 porcs utilisés pour les essais thérapeutiques, seront infestés expérimentalement par *Sarcoptes scabiei* (variété suis). L'infection expérimentale sera réalisée sur animaux immunodéprimés (corticothérapie par dexaméthasone pour réaliser l'immunosuppression, réévaluation de la dose plusieurs fois par semaine pour accroître l'intensité et la durée d'infestation parasitaire tout en limitant ses conséquences inflammatoires) afin de déclencher une infection plus reproductible que la sélection d'animaux naturellement malades et de ce fait de réduire le nombre total d'animaux utilisés.

L'absence de données pertinentes disponibles dans la littérature ne nous permet cependant pas de calcul statistique du nombre de porcs nécessaires pour notre étude ou de calcul de puissance. Le nombre de porcs a été évalué à partir de données préliminaires obtenues dans un autre laboratoire pour utiliser le plus petit nombre d'animaux possibles.

Les animaux seront mis à mort au bout de 6 mois pour éviter l'apparition d'effets secondaires liés à l'immunosuppression. Il n'est pas possible de réverser l'immunosuppression sans atteinte au bien-être des animaux et donc de les placer à la fin des expérimentations.

Il y aura au maximum un essai thérapeutique tous les 6 mois soit l'utilisation au maximum de 150 porcs sur 5 ans (6 porcs pour le maintien du modèle par an + 24 porcs pour les essais thérapeutiques par an).

Les porcs seront maintenus au maximum en groupe (seule exception lors de l'administration des molécules tests, en particulier s'il s'agit d'administrations topiques) sur une litière de copeaux avec aliment et eau à volonté. Ils seront entraînés à la manipulation et du sirop de cassis leur sera donné comme "récompense" pour faciliter leur acceptation/apprentissage des manipulations. La corticothérapie sera également donnée par voie orale dans des bonbons type "chamallows". Des balles à mâcher et des ballons seront mis à leur disposition en permanence. Les animaux seront examinés quotidiennement, y compris les weekends et les jours fériés.

La gale en elle-même n'est pas une maladie douloureuse. Elle provoque un inconfort dû au prurit mais pas de douleur. De plus, les corticoïdes utilisés pour l'immunosuppression ont un effet calmant les démangeaisons.

Les prélèvements des parasites sont également superficiels (grattage des croûtes) et non douloureux.

Enfin, pour éviter au maximum les gestes invasifs, nous utiliserons pour le suivi de l'infestation, un appareil de microscopie confocale *in vivo* pour étudier le parasite. Cette technique est totalement indolore pour l'animal.

La seule technique potentiellement douloureuse (réalisation de punch biopsies) sera réalisée sous sédation.

**19967** L'Homme est un organisme rythmique composé de plusieurs horloges biologiques disséminées dans le corps et sous le contrôle d'une horloge centrale située dans les noyaux suprachiasmatiques (SCN) du cerveau. La lumière, qu'elle soit naturelle ou artificielle, influence cette horloge centrale par le biais des cellules à mélanopsine situées dans la rétine, et de ce fait, impacte notre comportement et notre physiologie. La lumière a également un effet direct sur ces derniers par les projections des cellules à mélanopsine dans différentes régions du cerveau, dont celles régulant la balance énergétique et la prise alimentaire.



Une corrélation entre la pollution lumineuse, les problèmes de sommeil et le taux d'obésités et de diabètes dans notre société a par ailleurs été démontrée. Plus spécifiquement, une exposition à la lumière bleue la nuit peut provoquer une modification du métabolisme du glucose et donc une prise de poids chez l'homme et chez l'animal.

Sachant qu'une exposition à la lumière en matinée entraîne une synchronisation de l'horloge centrale, nous essayerons de déterminer si une exposition supplémentaire à la lumière en journée améliore les rythmes de prise alimentaire et de concentration de glucose. De plus, nous essayerons de comprendre si ces mécanismes d'action sont dépendants de l'horloge principale (SCN) d'une part, et de l'horloge rétinienne dans les cellules à mélanopsine d'autre part. Dans un deuxième temps, nous pourrions définir si un traitement lumineux en matinée peut contrer les effets délétères de l'exposition à la lumière pendant la nuit. Ceci dans le but de mettre en place des solutions adaptées pour l'homme, et ainsi diminuer les taux d'obésité et de diabète liés à une mauvaise exposition à la lumière dans notre société moderne.

Nous utiliserons des souris transgéniques rendues incapables d'exprimer le gène *Bmal1* (gène indispensable à la genèse des rythmes circadiens) soit dans l'horloge centrale (SCN), soit dans l'horloge de la rétine. Cette approche nous permettra d'observer les différences de comportements alimentaires des animaux et de déterminer l'implications plus ou moins importante de l'une ou l'autre horloge dans les mécanismes d'actions. Les répercussions de la lumière étant mesurées par la prise et la préférence alimentaire, ainsi que la tolérance au glucose de chaque animal, il n'y a pas de remplacement possible.

Le projet utilisera au total un nombre maximal de 510 souris pour l'ensemble de l'expérience. L'effectif a été déterminé dans le respect des règles statistiques en vigueur et de manière à obtenir une bonne reproductibilité des résultats tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux utilisés. En ce qui concerne le raffinement de l'expérience, les animaux sont hébergés en cages individuelles avec du matériel d'enrichissement (nids en coton, bâtons à ronger). Les animaux seront suivis quotidiennement et les expériences seront immédiatement arrêtées si des comportements aberrants sont observés. Si le point limite devait être atteint (perte de poids persistante >20%, stéréotypies graves ou troubles moteurs importants ou signes de douleur) l'animal sera mis à mort. Afin de minimiser les conséquences de l'isolement, les animaux garderont le contact visuel et olfactif. Toutes procédures chirurgicales se feront sous anesthésie/analgésie.

**19968** De nombreux produits chimiques inhalés ou ingérés de façon délibérée ou non peuvent avoir des effets toxiques sur le foie. L'hépatite toxique est une inflammation du foie causée par des produits chimiques. Le foie est sensible aux produits chimiques parce qu'il joue un rôle fondamental dans leur métabolisme. Le foie a pour fonction de traiter les produits chimiques et médicaments qui pénètrent dans le sang et de transformer ces produits dont l'excrétion par les reins est difficile en éléments pouvant être éliminés de l'organisme comme par exemple par l'urine. Ce processus de transformation chimique dans le foie s'accompagne, dans certains cas, de la formation de produits dérivés hautement toxiques. Et ces produits dérivés hautement toxiques peuvent attaquer le foie. Nous avons démontré que, chez la souris, une protéine libérée par les cellules et les organes (foie, graisse, cœur, rein et muscle) 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  $\beta$ -oxydation. Sur la base de ces observations, nous déterminerons si l'inhibition de cette protéine peut prévenir la toxicité hépatique aiguë 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 toxicité hépatique aiguë 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 = 3000). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales sont négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles.

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. 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 et des soins adaptés. 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.

**19969** Les modèles animaux sont indispensables à l'étude de pathologies humaines, telles que les accidents vasculaires ischémiques et hémorragiques ou le développement de cancers et leurs impacts sur les fonctions cérébrales, et permettent de caractériser de nouvelles cibles thérapeutiques contre lesquelles des traitements innovants peuvent être testés *in vivo*. Pour l'étude de ces nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique, le choix de la voie d'administration de molécules marquées ou de traitements potentiels est crucial afin de vérifier l'impact des molécules sur le comportement ou la plasticité cérébrale et/ou de permettre la meilleure détection dans les tissus cibles étudiés comme le cerveau.

Dans notre laboratoire sont utilisés des modèles murins d'hémorragie cérébrale (sous-arachnoïdienne, HSA), des modèles permettant d'étudier le développement de cancers (glioblastome, tumeur mammaire, mélanome) ou d'étudier les effets du cancer et de leurs traitements sur les performances comportementales (apprentissage, mémoire, émotions), la fatigue et les mécanismes neurobiologiques. Par exemple, dans le cas des effets du cancer, des facteurs plasmatiques libérés par la tumeur, tels que des petites vésicules membranaires appelés exosomes connus pour préparer des niches métastatiques cérébrales, sont actuellement en cours d'étude pour rechercher leur impact sur les fonctions émotionnelles et cognitives chez la souris. Des molécules d'intérêt thérapeutique marquées (fluorescence, radiomarquage) sont utilisées dans plusieurs projets, pour par exemple étudier la biodistribution de molécules ciblant des récepteurs membranaires que nous avons caractérisés, pour leur utilisation en imagerie diagnostique, comme traitement de tumeurs y compris cérébrales, ou pour prévenir les conséquences d'une hémorragie cérébrale. Des thérapies administrées sous forme liposomale sont aussi à l'étude, et ne présentent donc pas les mêmes caractéristiques de biodistribution que des molécules chimiques non encapsulées.

Cependant, lorsque ces molécules sont administrées par injections intraveineuses dans les veines de la queue, des temps de résidence courts dans le système systémique peuvent expliquer des problèmes de détection de ces molécules, notamment dans le cerveau, comme déjà observé dans notre pratique et aussi décrits dans la littérature. Les difficultés rencontrées peuvent s'expliquer par une séquestration des molécules marquées dans les tissus de la queue, et/ou une captation importante par le foie et les reins. De plus, les injections répétées dans les veines caudales sont rendues plus difficiles car les veines ne sont pas facilement visibles chez la souche de souris C57Bl/6J. De plus, pour chaque type de formulation pharmacologique, il est possible qu'une voie d'administration se montre plus efficace qu'une autre.

Ainsi, l'objectif de cette demande est de caractériser des voies alternatives d'administration intraveineuses (IV) comme des injections dans le sinus rétro-orbitaire (RO) ou des administrations rectales afin de s'affranchir des inconvénients décrits ci-dessus, d'augmenter la reproductibilité, de limiter le risque d'échec des injections, de permettre des injections répétées ainsi que de réduire le nombre d'animaux utilisés par projet. L'injection retro-orbitaire est une méthode reproductible et

efficace qui permet l'administration répétées de molécules. L'administration rectale est intéressante de par son faible niveau de sévérité et permet donc la répétition des injections. En revanche, l'absence de référentiels sur la biodistribution de molécules chimiques, de vésicules ou de liposomes, nécessite une étude d'évaluation et de comparaison.

Pour apporter des preuves de supériorité de ces méthodes par rapport à une IV caudale, ce projet consiste à comparer chez la souris 2 voies d'administration : la voie RO et la voie rectale, afin d'évaluer la biodistribution de molécules, de ligands d'intérêt thérapeutique ou de vésicules marquées. Ainsi l'étude 1 portera sur une molécule sous 2 formes liposomales et leur contrôles (2 formes liposomales sans molécule d'intérêt ou véhicule). L'étude 2 portera sur 4 molécules associées ou non à un marqueur fluorescent et associées ou non à un fragment peptidique permettant de faciliter le passage à travers la barrière hématoencéphalique et leurs contrôles (molécules non fluorescentes et leur véhicule). L'étude 3 portera sur 4 types d'exosomes tumoraux (issus de 4 cancers différents) et leur contrôle. Pour chacune de ces 3 études, la moitié de ces molécules ou particules seront administrées à des souris immunocompétentes (souche C57Bl/6) et l'autre moitié à des souris immunodéficientes (nude), l'immunosuppression pouvant impacter la distribution des particules. Ces injections seront répétées pour permettre une accumulation des molécules ou des particules étudiées dans les différents organes. Ces molécules ou particules, non connues pour être délétères, seront donc administrées tous les 2 jours par voie RO avec un maximum de 2 injections par oeil au total avec un délai minimum de 24h entre 2 injections. Dans le cas de l'administration par voie RO, les injections seront faites à l'aide d'aiguilles fines dans le sinus veineux RO. Dans le cas de l'administration par voie rectale, les instillations seront réalisées à l'aide de petites sondes à bout arrondi, à raison de 10 instillations maximum avec un délai minimum de 48h entre 2 instillations. Puis des prélèvements de sang et d'organes (cerveau, rein, foie, coeur, rectum ...) seront réalisés à différents délais (4h, 12h, 24h) après la dernière administration afin de vérifier la présence des molécules ou particules étudiées dans ces différents échantillons biologiques et ainsi de déterminer le meilleur délai et la voie d'administration la plus efficace pour détecter chacune d'elles. Dans le cas de l'étude 2, seul 1 des 3 délais sera évalué chez les souris nude après validation chez les souris C57Bl/6. Des groupes de 4 souris seront nécessaires aux diverses études biologiques et histologiques (4 pour tissus fixés au formaldéhyde et 4 pour tissus non fixés). Pour chacune des 3 études, pour chacun des délais étudiés, pour chaque souche de souris (C57Bl/6 ou nude) et pour chacune des 2 voies d'administration, entre 4 et 5 groupes de 4 souris seront nécessaires. Un total de 1184 animaux sera utilisé pour le projet qui doit durer 5 ans. Durant ce projet, la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) sera respectée. Remplacer : L'utilisation de l'animal est indispensable afin d'étudier la bio-distribution des molécules d'intérêt dans différents organes. Réduire : le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum afin de permettre de réaliser toutes les études histologiques et biologiques prévues. Raffiner : Les expériences débiteront après une acclimatation des animaux aux conditions d'hébergement et à la manipulation par l'expérimentateur. Durant toute la durée de l'expérimentation, un suivi quotidien des animaux sera réalisé par du personnel expérimenté 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. Dans le cas de l'atteinte d'un point limite, une mise à mort sera réalisée.

**19970** Le carcinome rénal représente 3% des cancers humains. Malgré la chirurgie et les traitements ciblés, les échecs thérapeutiques se traduisent par une résistance des tumeurs aux drogues et conduit irrémédiablement à la formation de métastases souvent fatales. Il s'avère donc fondamental d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour ce cancer puis développer de nouvelles molécules inhibitrices.

La protéine responsable de la rétention d'eau nécessaire dans le corps est contenue dans certaines régions du rein et son activation hormonale (par la vasopressine) conduit à la prolifération tumorale. En inhibant cette protéine à l'aide d'inhibiteurs spécifiques, nous parviendrons à inhiber la prolifération tumorale dans le rein. A l'heure actuelle, seul un médicament le Tolvaptan est sur le

marché pour une autre maladie proliférative du rein, la polykystose rénale mais malheureusement ce médicament peut être hépatotoxique.

Une nouvelle molécule, la Mambaquarétine (MQ) est une toxine issue de venin de mamba vert caractérisée dans notre laboratoire en tant qu'inhibiteur complet et sélectif de cette protéine. Cette toxine inhibe sans toxicité la formation de kystes présents sur une souris atteinte de polykystose rénale.

Dans notre projet, notre objectif est de démontrer que la Mambaquarétine peut aussi être utilisée dans le traitement du cancer rénal en utilisant un modèle animal. Si les résultats sont prometteurs, notre objectif futur serait de pouvoir réaliser un essai thérapeutique sur l'homme.

Pour ce faire, nous allons tester la Mambaquarétine *in vivo* sur un modèle animal de souris immunodéficientes sur lesquelles nous aurons transplanté des cellules tumorales rénales humaines en sous-cutané sur leur flanc droit pour produire des tumeurs comme cela a déjà été réalisé avec l'inhibiteur médicament et plus classiquement en oncologie.

Dans un premier temps, il faudra faire des expériences pilotes pour retrouver les conditions de l'essai *in vivo* similaires à la littérature à savoir la quantité et le type de cellules rénales cancéreuses à injecter pour produire la tumeur ainsi que la dose efficace de Mambaquarétine et de l'autre inhibiteur de référence. Pour cela, nous utiliserons 130 souris.

Dans un deuxième temps, afin de voir l'effet anti-tumoral de la Mambaquarétine, un test *in vivo* sera mené en comparant des groupes contrôle sans inhibiteur, à la Mambaquarétine puis aux molécules références (vasopressine et inhibiteurs de référence). Pour ce faire, nous utiliserons 84 souris.

Globalement, le projet sera réalisé sur une année avec 214 souris.

Nous appliquerons la règle des 3R:

-Remplacer: L'effet anti-prolifératif et anti-migratoire de MQ a été démontré sur des cellules au préalable mais le modèle *in vivo* n'est pas substituable car il est important de savoir si MQ est aussi antiproliférative sur un organisme vivant complet avant de la tester chez l'homme

-Réduire: Le nombre d'animaux est strictement restreint au nombre suffisant pour visualiser un effet inhibiteur statistique.

-Raffiner: Pour diminuer le stress, nous procédons à des habituations à l'environnement que nous enrichissons, habitude à la préhension par l'expérimentateur et à des hébergements des animaux en présence d'autres congénères dans la même cage. Pour chaque procédure, les points limites sont définis notamment la taille de la tumeur. Tout au long des expérimentations, les animaux sont suivis et notés journalièrement selon une grille d'évaluation qui permet objectivement de savoir si leur bien-être est préservé ou si leur état nécessite une intervention thérapeutique ou si les points limites des procédures sont atteints.

**19971** Dans le cadre du développement d'un nouveau vaccin contre l'enterite hémorragique de la dinde, le demandeur de l'autorisation pour le vaccin doit démontrer l'innocuité du support de culture du virus vaccinal pour les dindes.

L'objectif de ce projet est donc de démontrer l'innocuité d'un support de culture (cellules) pour virus vis à vis de l'espèce cible d'un vaccin : la dinde.

L'amplification du virus sur cellule permettrait de proposer une alternative aux vaccins produits sur animaux.

Le nombre d'animaux utilisés pour l'essai est réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des résultats significatifs.

Les surfaces d'hébergement sont en accord avec la directive 2010 63 UE.

Les conditions d'hébergement sont vérifiées quotidiennement (éclairage, température, hygrométrie, nourriture, abreuvement).

Une procédure d'évaluation des points limites des animaux est mise en place. Cela permet d'évaluer toute douleur physique ou psychique sévère, souffrance ou état moribond. La procédure permet, le

cas échéant, un arrêt du protocole, sa modification, l'administration d'un traitement symptomatique, voire l'euthanasie de l'animal.

L'état de santé des animaux est vérifié quotidiennement par une personne compétente, et le vétérinaire responsable est consulté afin de prendre d'éventuelles mesures nécessaires.

L'essai sera réalisé sur la dinde, il s'agit de l'espèce cible du vaccin, permettant d'apporter les informations les plus pertinentes. Un maximum de 40 animaux utilisés est prévu pour l'essai.

L'essai prévu est uniquement possible sur animal.

Les tests in-vitro réalisés jusque-là n'ont pas permis de conclure définitivement sur l'innocuité de la ligné cellulaire utilisée. Seul un test in -vivo permettra de mettre en évidence la présence / absence du virus de l'hépatite de la dinde.

## **19972** But du projet : la recherche appliquée et translationnelle

Les maladies cardiovasculaires représentent la 1ère cause de mortalité dans la population générale. La prise en charge de ces pathologies repose dans un premier temps sur leur diagnostic précis. Les méthodes d'imagerie médicale telles que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) cardiaque couplée ou non à de la tomographie par émission de positron (TEP) sont couramment employées pour discerner les différents dysfonctionnements cardiaques. Malheureusement, ces méthodes d'imagerie classique ne permettent que d'identifier des déformations anatomiques. Pour cette raison, il est actuellement très compliqué de différencier des situations n'impliquant pas de déformation anatomique comme les cardiopathies inflammatoires aux stades précoces ou certains troubles ischémiques du myocarde.

L'objectif de ce projet de recherche est d'évaluer le potentiel de la stratégie de l'imagerie moléculaire en IRM et en IRM-TEP pour améliorer le diagnostic de plusieurs troubles cardiovasculaires en révélant localement l'activité inflammatoire. Nous testerons ces méthodes d'imagerie innovantes sur 3 pathologies cardiaques pour lesquelles une différenciation diagnostique précoce via la révélation de l'inflammation vasculaire pourrait nettement améliorer la prise en charge ; l'infarctus du myocarde, l'endocardite et la myocardite. Nous évaluerons également la capacité de cette nouvelle méthode de dépistage à révéler la présence de cardiomyopathie atriale précoce spécifique de différentes situations cliniques (hypertension artérielle, diabète, obésité) avant même l'installation de fibrose. Nous incluons pour cela des cohortes d'animaux caractérisés par ces facteurs de comorbidités. Nous comparerons à d'autres agents de contraste qui sont actuellement utilisés en clinique pour évaluer l'activité inflammatoire ; le gadolinium en IRM pondéré en T1 et le Fluorodéoxyglucose (18F-FDG) en IRM-TEP.

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).

### **REMPACEMENT :**

Nous utiliserons en effet des agents de contraste dont l'efficacité pour révéler l'activité inflammatoire a déjà été validée dans de précédentes études. Cette efficacité est cependant limitée au niveau cardiaque du fait d'un intense signal myocardique basal lié à l'activité métabolique permanente de ce tissu, et nécessite le développement de nouvelles stratégies. La prochaine étape nécessaire est l'étude préclinique en IRM sur des modèles de cardiopathie inflammatoire et ischémique. Il n'y a pas d'autre solution pour reproduire la complexité de la circulation cardiaque et l'impact de la réaction inflammatoire que de tester sur des modèles chez l'animal anesthésié.

### **REDUCTION :**

L'inclusion de plusieurs pathologies cardiaques en parallèle permet d'utiliser le même groupe d'animaux sains en tant que contrôles pour plusieurs modèles et ainsi de réduire le nombre total d'animaux nécessaires.

La souris et le rat sont les 2 espèces animales les plus étudiées dans le domaine des pathologies cardiovasculaires. L'anatomie et la physiologie de la circulation cardiaque sont donc parfaitement connues. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans

la littérature rend ces espèces particulièrement intéressantes pour étudier l'efficacité de l'imagerie moléculaire pour mesurer l'activité inflammatoire. Pour l'étude des cardiopathies inflammatoires (myocardite et endocardite) et de l'infarctus du myocarde, nous utiliserons des modèles de souris car nettement mieux décrits. Pour l'étude de l'impact des facteurs de comorbidité, nous souhaitons bénéficier d'une résolution plus importante en IRM et travaillerons donc avec des rats.

Nous consultons un biostatisticien avant de procéder à de telles études pour s'assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Dans ce projet, 450 souris et 450 rats seront nécessaires pour étudier l'efficacité.

#### RAFFINEMENT :

Les animaux seront maintenus anesthésiés durant la chirurgie et tout au long de l'imagerie, puis seront euthanasiés en conformité avec la loi.

Les mesures pour réduire au maximum toute forme d'inconfort et de souffrance sont, outre celles mentionnées ci-dessus, le suivi strict et rapproché des animaux, l'hébergement en petits groupes sociaux stables (n=5 pour les souris, n=2 pour les rats) avec un enrichissement minimum (un rouleau cartonné + une feuille de papier essuie-tout), et la manipulation uniquement par des personnels expérimentés. Les animaux seront maintenus dans des conditions optimales d'hébergement, dans un environnement stabilisé en température (21°), hygrométrie (55%), luminosité (100 lux), et durée du cycle de lumière (12h/12h) et sont sous l'attention quotidienne du personnel de l'animalerie.

Mots clefs : cardiopathie inflammatoire ; infarctus du myocarde ; imagerie moléculaire ; IRM ; TEP.

**19973** Les femmes vivent désormais plus d'un tiers de leur vie après le début de la ménopause. La baisse de la production d'œstrogènes pendant cette période s'accompagne de troubles fonctionnels qui affectent la qualité de vie. En particulier, les femmes de plus de 65 ans présentent une mortalité plus élevée au cancer colorectal et un taux de survie à 5 ans inférieur par rapport à leurs homologues masculins du même âge. Le rôle protecteur de la voie des œstrogènes dans le développement du cancer du côlon a été étudié dans des modèles animaux. En particulier, l'exposition de rats femelles ovariectomisées aux œstrogènes a réduit l'incidence des tumeurs du côlon de 71%. Il existe différentes théories sur les raisons pour lesquelles les œstrogènes diminueraient la susceptibilité à l'inflammation intestinale et au cancer du côlon qui lui est associé. Notre laboratoire a développé une lignée de souris knock-out (Reg3b<sup>-/-</sup>) qui présente une susceptibilité différentielle entre les souris mâles et femelles dans des modèles expérimentaux d'inflammation intestinale et de cancer du colon.

Dans la continuité de projets antérieurs, notre objectif consiste à mieux comprendre cet effet protecteur et d'évaluer l'efficacité de modulateurs des œstrogènes en combinaison avec des immunothérapies. Sous réserve de résultats prometteurs, les expériences de ce projet impliqueront un maximum de 2016 souris sur une période proposée de 5 ans. Ce nombre maximal d'animaux se justifie par la combinaison des paramètres expérimentaux permettant l'étude des mécanismes d'intérêt. Les procédures expérimentales respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Un suivi strict des souris sera effectué par du personnel formé et habilité. Il est à noter aussi que préalablement aux expériences sur animaux, des études *in vitro* et *in vivo* ont permis de définir les méthodes de raffinement (utilisation de l'endoscopie pour évaluer la progression tumorale et le moment optimal pour l'autopsie) et de réduction (par une analyse multiparamétrique sur chacune des souris).

**19974** Il est de plus en plus admis que le fonctionnement de nos organes périphériques est lié à notre cerveau et inversement, un dysfonctionnement de nos organes périphériques influence notre cerveau. Il se dégage une symbiose importante, l'axe foie/cerveau.

Les maladies métaboliques telles que l'obésité et le diabète de type II sont en constante augmentation dans les pays industrialisés. Ces pathologies peuvent être induites par des facteurs génétiques ou environnementaux (sédentarité, alimentation riche en glucides/lipides). De plus,

l'utilisation croissante de pesticides dans l'agriculture, perturbateurs endocriniens retrouvés dans notre alimentation vient amplifier cette tendance.

Les récepteurs nucléaires CAR (Constitutive Androstane Receptor) sont exprimés dans le foie et dans d'autres organes comme l'intestin, le cerveau et les reins. Ils sont principalement impliqués dans la détoxification endogène (bilirubine) et exogène (xénobiotiques), et présentent un rôle dans la régulation du métabolisme.

Nous avons déjà effectué une étude sur des souris génétiquement invalidées pour ces récepteurs de manière totale (KO total) qui nous a permis de dégager des effets de l'absence de ce récepteur sur le cerveau. Il nous paraît d'un grand intérêt de refaire des expérimentations avec CAR invalidé spécifiquement au niveau hépatique (KO hépatique) et permettre de réellement conclure sur l'incidence de l'axe foie/cerveau.

Nous appliquerons la règle des 3R de la façon suivante :

Remplacer : L'étude globale de comportement proposée chez la souris ne peut être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Réduire : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum permis par les tests statistiques. Les protocoles de comportement choisis, déjà utilisés en routine, n'induisent pas de morbidité. Le suivi longitudinal réalisé en amont (mesure de paramètres physiologiques) et en aval (électro-encéphalographie) permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés dans des locaux adaptés, par gages de 4 individus, avec enrichissement. 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. 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 120 souris sur une durée maximum de 5 ans.

**19975** En 2019, on compte plus de 460 millions de personnes diabétiques, et plus de 4 millions de décès dus à cette pathologie.

La prévalence du diabète ne fait qu'augmenter. 10% des patients sont atteints de diabète de type 1, et jusqu'à présent seule l'injection d'insuline exogène permet de rétablir une glycémie quasi-équilibrée, seulement cela n'est pas sans risque. L'allogreffe d'îlots de Langerhans a été développée et a montré son efficacité pour le traitement des diabètes sévères.

Un modèle animal (souris) de greffe de cellules pancréatiques a été mis au point et montre une corrélation entre la fonction du greffon humain chez la souris (dosage d'hormone humaine) et la fonction obtenue chez le patient receveur de la même préparation cellulaire. Le modèle utilisé est la souris immunodéficiente greffée avec les cellules humaines au niveau de la capsule rénale.

Afin d'améliorer la prise de greffe, la fonction et essayer de régénérer les cellules pancréatiques, nous proposons d'exploiter plusieurs stratégies: 1/ la cotransplantation des îlots de Langerhans avec les cellules de parathyroïde et 2/ l'utilisation de médicaments "anti-diabétiques" prometteurs.

Afin de respecter la règle des "3R", Réduire: Nous utiliserons le juste nombre d'animaux afin d'obtenir des résultats probants et statistiquement satisfaisants. Remplacer: Aujourd'hui, pas de technique *in vitro* performante permet de maintenir les cellules (îlots) vivantes sur le long terme; Aussi, l'usage de l'animal est nécessaire pour reproduire la transplantation. Raffiner: Les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale.

Pour l'ensemble de ce projet, nous envisageons d'utiliser 760 animaux.

**19976** L'endométriose est une maladie gynécologique chronique caractérisée par la présence de tissu endométrial (glandes endométriales et stroma), aussi appelé tissu utérin, en dehors de la cavité utérine. Ce tissu crée des lésions hormono-dépendantes responsables d'une inflammation, chez la femme en âge de reproduction, pouvant provoquer des dyspareunies profondes (douleurs ressenties lors d'un rapport sexuel), des dysménorrhées intenses (règles douloureuses), des troubles digestifs et/ou urinaires et une infertilité.

La prévalence est estimée à 10% des femmes en âge de procréer et à 1/3 des femmes de 16 à 50 ans souffrant de douleurs menstruelles aiguës. Cette maladie n'est pas mortelle cependant elle a un impact négatif sur la vie sociale de ces femmes car elle dure jusqu'à la ménopause définitive de la femme. Cette pathologie est multifactorielle et il est complexe d'étudier son évolution au sein même des patientes sans envisager des analyses lourdes nécessitant des anesthésies. Même si actuellement aucun modèle animal disponible ne permet de reproduire à l'identique tous les aspects de la pathologie humaine, ces modèles expérimentaux représentent des étapes importantes dans la compréhension de la pathogenèse endométriosique (principalement de l'endométriose péritonéale) et dans le développement de nouvelles méthodes diagnostiques ou dans la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques.

Les modèles animaux sont fréquemment utilisés dans la recherche fondamentale sur l'endométriose. Ils permettent notamment de conduire des études les plus contrôlées possibles, en éliminant les facteurs confondants tels que l'âge, le statut hormonal ou le régime alimentaire des patientes, mais aussi les facteurs liés à leur environnement. Il existe aujourd'hui deux types de modèles d'endométrioses : un modèle homologue consistant en la greffe de tissu de rat chez le rat immunocompétent et un modèle hétérologue consistant en la greffe de tissus endométriotiques de patients chez la souris immunodéprimée. C'est ce dernier modèle qui sera inclus dans le projet.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle d'endométriose induit par la greffe de tissus endométriotiques de patients chez la souris immunodéprimée. Ce modèle permet de pouvoir étudier la vascularisation des lésions, leur dissémination dans l'organisme. De plus, nous souhaiterions évaluer dans ce même modèle la douleur pelvienne et la fertilité qui sont les symptômes cliniques majeurs dans la pathologie. Ainsi ce modèle, une fois mis en place, nous permettra d'évaluer l'effet de candidats médicaments.

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 1390 souris sur 5 ans en raison de 12 animaux par groupe, le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure.

Ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R :

**Remplacement** : Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapie pharmacologique efficace pour traiter l'endométriose et aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* ne peut mimer la pathologie dans son ensemble et dans sa complexité.

Ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

**Réduction** : 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** : En accord avec la règle de raffinement, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale avec maintien de la température corporelle via l'utilisation de plaque chauffante thermo-régulée et un analgésique sera administré après l'intervention chirurgicale. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE à savoir 4 à 8 souris par cage d'hébergement et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. L'état des animaux sera suivi quotidiennement par du personnel compétent afin de s'assurer de leur bien-être



et de l'absence de point limite à savoir prostration, perte de poids, présence de crampes abdominale, présence de blessure, .... Après chaque intervention chirurgicale, une attention particulière sera apportée sur le réveil des animaux et l'absence d'agressivité vis-à-vis de ces congénères.

Si un animal présentait un point limite, il serait isolé et hydraté et mis en présence de nourriture dans la litière. Si son état ne s'améliorait pas dans les 48h, les expérimentateurs compétents excluraient l'animal de l'étude et l'euthanasieraient.

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

**19977** Les hémorragies utérines aiguës sont des saignements excessivement abondants ou prolongés qui représentent l'une des premières causes de venue aux urgences gynécologiques. Il s'agit d'une problématique clinique courante pour laquelle aucune solution simple et rapide n'existe pour arrêter les saignements utérins. Face à ce constat clinique, notre projet scientifique vise à développer un pansement utérin hémostatique destiné à stopper des saignements de différentes sévérités d'une part, et d'autre part de démontrer l'absence d'effet délétère du pansement sur la fertilité. Pour la mise en oeuvre de ce projet, bien qu'il existe plusieurs modèles de saignement dans la littérature, c'est le rat qui a été choisi. En effet nos prototypes de pansement peuvent être découpés pour s'adapter à l'anatomie du petit animal et des saignements de sévérité importants ne sont pas nécessaires pour tester l'efficacité hémostatique. De plus, l'équipe projet a déjà une bonne connaissance de cette espèce.

Ainsi, les deux aspects étudiés feront l'objet de deux procédures expérimentales distinctes. La première pour vérifier l'efficacité du pansement est sans réveil et concernera 43 animaux, la deuxième consistant à évaluer l'impact du pansement sur la fertilité est classée comme modérée et comprendra 25 animaux dont 5 animaux non comptabilisés car ils ne subissent rien d'égale ou supérieur à la piqûre d'une aiguille. Soit un total de 63 animaux pour l'intégralité du projet.

L'étude d'efficacité de différents prototypes de pansements consistera à déclencher un saignement chez l'animal et à le stopper. Il s'agira de valider l'un des prototypes comme étant le plus efficace.

Compte tenu des différences physiologiques des tissus utérins chez l'animal comparés à ceux de la femme, il n'existe pas de modèle de saignement utérin chez l'animal. L'étude reposera donc sur un modèle de saignement du foie, couramment décrit dans la littérature. Les animaux seront sous anesthésie générale, complétée par un traitement analgésique pour éviter toute douleur pendant la procédure. Lorsque que le foie saignera, le pansement hémostatique sera directement déposé pour stopper l'hémorragie. A l'issue de la procédure, les animaux ne seront pas réveillés afin d'éviter toute séquelle ou souffrance inutile.

Le prototype validé fera ensuite l'objet d'une évaluation de son impact sur la fertilité puisque le pansement a pour finalité d'être utilisé dans l'utérus des femmes. Il s'agira de démontrer l'absence d'effet délétère du pansement hémostatique sur la fertilité. Pour cela, le pansement sera implanté dans l'une des cornes utérines de la rate au cours d'une intervention chirurgicale. Le nombre d'animaux nécessaires est estimé à 20 femelles, qui seront randomisées pour l'implantation du pansement dans la corne utérine droite ou gauche selon le groupe de randomisation. Une mise à la reproduction sera ensuite réalisée pour laquelle 5 mâles seront également nécessaires. Il est attendu que le nombre de grossesses observées dans le groupe de rates ayant reçu le pansement hémostatique soit équivalent au nombre de grossesses observées dans le groupe des rates contrôle (sans pansement).

Dans le cadre de ce projet, tout sera mis en oeuvre pour respecter au mieux la règle des 3R :

Remplacer : le projet consiste à démontrer l'efficacité d'un dispositif médical qui a d'ores et déjà été étudiée et validée via des études *in vitro*. Avant de passer en phase d'étude clinique, l'étape *in vivo* est donc nécessaire et ne peut être remplacée pour valider ce concept, impliquant notamment des processus de coagulation réalistes parce qu'il s'agit d'un organisme vivant.

Réduire : après une synthèse bibliographique, le protocole a été réfléchi de façon à réaliser plusieurs gestes identiques sur un même animal pour la validation du saignement. Le nombre d'animaux a donc été réduit au strict minimum, en considérant toutefois la faisabilité de l'étude et un nombre suffisant permettant d'observer une différence significative entre les groupes.

Raffiner : nous attacherons une importance majeure au raffinement des conditions d'hébergement et d'enrichissement de l'environnement (accès à plusieurs textures de litière, stimulation des instincts naturels de rongement, abri pour se cacher). La première procédure se déroulera intégralement sous anesthésie générale avec apport d'analgésique préopératoire et un ajustement des doses en cas d'apparition de signe de douleur ou de réveil (modification de la fréquence respiratoire...). Au cours de cette procédure, un saignement trop important entraînerait la mise à mort anticipée de l'animal.

Concernant la deuxième procédure, le traitement analgésique (type buprénorphine) sera injecté en phase pré-opératoire, associé à un traitement anti-inflammatoire en post-opératoire immédiat (type meloxicam) afin d'assurer une récupération rapide des femelles opérées. De plus toutes les précautions seront prises pour assurer de bonnes conditions d'asepsie. Leur surveillance quotidienne sera accrue jusqu'à 72 h post-opératoire. Un animal présentant des signes de douleur (toilettes négligée, prostration, contractions abdominales) dans les premières 24h pourra recevoir une dose complémentaire unique d'anti-inflammatoire (type meloxicam) afin de le soulager. Une perte de poids supérieure à 20 % en 72h post-opératoire donnera lieu à la mise à mort de l'animal.

**19978** D'après des enquêtes ethnopharmacologiques s'adressant à la population caribéenne, celle-ci a recours à l'usage de plantes à des fins médicinales à hauteur de 20%. Ce recours thérapeutique leur permet de se soigner à des coûts modiques tout en conservant les pratiques médicinales traditionnelles populaires. Ces résultats ont été examinés par un groupe d'experts formé de plus de 200 spécialistes dans les domaines de l'ethnobotanique, la chimie, la pharmacie, la médecine et le travail social sur le terrain. Toutefois, bien qu'il n'y ait pas de "plantes toxiques", la partie-plante, le type d'extraction ou encore la voie d'administration peut devenir toxique selon la posologie. Il est donc important de fixer des limites entre les simples croyances et ce qui est utile et efficace, notamment en s'appuyant sur des études scientifiques *in vivo*, démontrant une compatibilité avec l'emploi.

L'objectif de ce projet, se basant sur une sélection d'espèces médicinales reportées dans les enquêtes ethnopharmacologiques, est de vérifier l'innocuité des parties de plantes afin de valider ces usages traditionnels chez la souris. Ces données pourront constituer à la fois un outil de formation pour le personnel des services de santé en général, et une source fiable de connaissances à la disposition de la population leur permettant de traiter efficacement les affections courantes à un coût modique en harmonie avec la tradition populaire.

Dans le présent projet, nous testerons l'innocuité des parties de plante utilisées sur plusieurs jours par la population comme infusion ou décoction en fonction de la partie végétale considérée. Pour ce faire, nous utiliserons le modèle de toxicité à doses répétées par voie orale sur des souris NRMI. Dans un essai, 4 extraits de plante seront testés à une dose unique quotidiennement durant 28 jours et comparés à leur solvant commun. Cela permettra de diminuer le nombre d'animaux utilisés dans le projet en ayant recours à un seul groupe "contrôle" pour 4 groupes "traités". En considérant les recommandations de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques pour la réalisation des tests de toxicité, chaque essai sera réalisé sur 50 animaux (n=10 par groupe, 5 mâles et 5 femelles). A raison de 100 extraits végétaux à tester et de 4 échantillons par essai, le nombre d'animaux nécessaire pour la réalisation de ce projet sera de 1250 souris. Toujours en accord avec les recommandations de l'OCDE, un screening comportemental sera réalisé et visera à évaluer l'activité locomotrice, la réactivité sensorielle et la force de préhension des animaux. De plus, un examen clinique général et une surveillance rapprochée des animaux sera mise en place quotidiennement afin de réaliser un suivi au plus près du bien-être animal. Pour cela, le système de scoring mouse grimace scale sera utilisé.

L'utilisation d'animaux vivants est indispensable à ce type de projet car il requiert d'une part une étude sur un modèle intégré, faisant appel à tous les mécanismes physiologiques et ainsi être le plus représentatif possible quant aux conditions humaines ; Et d'autre part il s'inscrit dans la continuité de travaux réalisés antérieurement par les différents partenaires caribéens de ce projet.

Les procédures seront exécutées par du personnel qualifié tout en appliquant les bonnes pratiques en expérimentation animale afin d'assurer le bien-être des animaux. Pour autant, si des signes cliniques de stress ou de souffrance dépassant les points limites fixés préalablement viendraient à se manifester, des mesures seront prises pour y remédier. Enfin, une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée par du personnel qualifié avant, pendant et après chaque essai et cela sur la durée totale de l'essai fixée à 28 jours. Les animaux seront hébergés par groupe de 5 dans des cages enrichies avec de la cellulose et un tunnel et auront un accès libre à l'eau et à la nourriture.

**19979** Les anticorps contre les antigènes tumoraux ont un intérêt potentiel pour le diagnostic *in vivo* non invasif des cancers. Actuellement, plusieurs anticorps ou traceurs à base de fragments d'anticorps sont maintenant disponibles et largement utilisés en clinique pour le traitement des tumeurs malignes hématologiques ou solides. L'identification et la validation de nouvelles cibles moléculaires sur la surface cellulaire, les avancées technologiques concernant la production des anticorps ainsi que les performances optimisées des caméras de dernière génération, incitent à pousser l'utilisation des anticorps monoclonaux radiomarqués pour une imagerie diagnostique *in vivo*, non invasive et à haut taux de spécificité.

Compte tenu de l'expérience déjà acquise au sein de notre laboratoire, les tumeurs pancréatiques neuroendocrines (panTNE) avec ou sans sécrétion hormonale seront considérées dans notre étude. L'objectif de notre projet est de développer des sondes moléculaires avec potentiel translationnel ciblant des récepteurs, radiomarquées avec le Zr-89, qui se prêtent à une future utilisation clinique chez les patients avec panTNE. Ces nouveaux traceurs seront finalement testés dans une étude longitudinale à partir de plusieurs modèles précliniques murins de panTNE sécrétants et non sécrétants développées chez la souris immunodéficiente et analysés par imagerie. Ainsi notre travail intègre une dimension translationnelle dont les résultats pourront directement influencer les pratiques cliniques actuelles concernant l'exploration fonctionnelle des panTNE. Les modèles qui seront utilisés dans notre étude seront obtenus en injectant en sous cutané à la souris une suspension de cellules BON (cellules métastatiques humaines) ou INS-1 (cellules bêta d'îlots de Langerhans de souris). La détection ainsi que le suivi de la croissance tumorale seront effectués par imagerie. En fin de suivi, les tumeurs seront prélevées post mortem pour des études histologiques conventionnelles.

Le nombre d'animaux prévus pour cette étude est de 432 souris maximum. Afin de respecter la règle des 3R, nous allons :

- Réduire : Nous n'utiliserons que 12 animaux par groupe, ces valeurs étant étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité interindividuelle.

- Raffiner : Les animaux sont placés à plusieurs par cage (2 à 3) afin de respecter l'interaction sociale et dans un environnement enrichi (frisure, tunnel) afin de stimuler leur activité motrice. Les animaux reçoivent de l'eau et de la nourriture ad libitum. Un suivi quotidien est assuré par du personnel spécialisé afin de mettre en évidence d'éventuels signes précoces de souffrance. Une grille d'observation adaptée au protocole permet d'évaluer ces critères de bien être animal. Pendant les séances d'imagerie les animaux sont anesthésiés, chauffés et leurs paramètres vitaux monitorés en continu.

- Remplacer : cette étude portant sur le suivi du développement tumoral par imagerie fonctionnelle *in vivo* elle ne peut être réalisée que chez l'animal vivant. Une étude bibliographique préalable a été faite afin d'éviter des doublons d'expériences.

**19980** Plusieurs études démontrent que la composition du microbiote intestinal change progressivement avec l'âge et que le microbiote intestinal des sujets âgés diffère significativement de celui des jeunes adultes tant en quantité qu'en qualité d'espèces bactériennes. La perte de diversité du microbiote peut être corrélée avec une altération des performances cognitives, une santé réduite et fragilité globale accrue. En effet, Le vieillissement est associé à une immunosénescence qui se caractérise par un affaiblissement de l'immunité cellulaire, qui peut prédisposer à une augmentation du risque d'infections. Toutefois, il a été démontré que la supplémentation en probiotiques augmente l'activité des lymphocytes T Natural Killer et des phagocytes, le bénéfice maximum de cette activation au sein du système immunitaire étant obtenu dans la population âgée.

Le but de cette étude est de valider une formulation à base de probiotiques (microorganismes viables, dont une quantité suffisante atteint l'intestin à l'état actif et exerce des effets positifs sur la santé) et de prébiotiques (ingrédients fermentés sélectivement qui permettent des changements spécifiques, à la fois dans la composition et/ou l'activité de la microflore gastro-intestinale qui confèrent des avantages sur le bien-être et la santé de l'hôte) sur la modulation du microbiote et de l'homéostasie immunitaire chez la souris âgée.

Cinq groupes de 12 animaux seront constitués: deux groupes contrôle adulte (3 mois et 18 mois) recevant une alimentation standard, un groupe souris âgées recevant une alimentation supplémentée avec le probiotique, un groupe souris âgées recevant une alimentation supplémentée avec le prébiotique, et un groupe souris âgées recevant une alimentation supplémentée avec le combo probiotique + prébiotique. Au total cette étude portera sur 60 animaux.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 R:

Remplacement: il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de formules nutritionnelles sur le microbiote et ses conséquences sur la physiologie d'un individu âgé.

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 non-invasives. Les animaux seront hébergés par cage de 4 et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress. Une anesthésie locale sera pratiquée lors des prélèvements sanguins. Des points limites spécifiques et des critères d'arrêt ont été définis pour chaque procédure.

**19981** La calcification vasculaire est fortement augmentée chez les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) et représente un facteur de risque d'événements cardiovasculaires (CV). Le taux de mortalité CV excessif des patients atteints d'IRC, l'absence d'un test diagnostique facile et non invasif de la calcification et l'indisponibilité actuelle d'un traitement pour réduire la calcification nécessitent d'identifier de nouveaux régulateurs. Le traitement devrait être préventif. Les nouvelles options thérapeutiques devraient préférentiellement être basées sur une meilleure compréhension des processus de calcification vasculaire afin de permettre une thérapie spécifique à l'avenir. Notre projet fait suite à une saisine précédente et a pour but d'étudier des inhibiteurs de la calcification vasculaire, de comprendre leur mode d'action ainsi que les répercussions sur les organes comme le coeur et le rein. Grâce à un projet collaboratif international (EU Innovative Training Network) et le financement européen associé, nous avons la possibilité d'utiliser des molécules nouvelles qui sont actives *in vitro* sur la calcification cellulaire. Plus particulièrement, nous évaluerons les effets de quatre produits précédemment sélectionnés (étude *in vitro*) par un partenaire. Pour déterminer leur efficacité dans l'organisme entier, nous projetons une étude sur le modèle de rat dit « VDN » qui développe une calcification vasculaire après une injection unique de vitamine D3 et administration ponctuelle de nicotine. Les travaux permettront de valider l'efficacité préclinique de ces nouveaux composés destinés à prévenir la calcification vasculaire dans ce modèle animal. Afin de respecter la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) le nombre d'animaux sera réduit en recherchant principalement un effet chez l'animal VDN. Le nombre d'animaux dans les groupes

témoins sains sera ainsi diminué de moitié. Donc, nous proposons d'étudier deux groupes témoins sains, un traité et un non traité, nécessaires pour l'évaluation des variations d'expressions génétiques (n=6), et 2 groupes VDN, un traité et un non traité, de 12 rats chacun pour pallier la variabilité de la calcification vasculaire dans ce modèle et pour compenser la mortalité induite par l'hypervitaminose, estimée à environ 15%. L'étude nécessitera donc l'utilisation de 240 rats sur 5 ans. Afin de raffiner les conditions d'expérimentation, des points limites adaptés et des critères d'arrêt sont prévus. Les traitements seront administrés à l'aide de pompes osmotiques implantées sous la peau ce qui permet d'éviter l'inconfort d'un gavage quotidien. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant d'étudier la pression artérielle et l'interaction avec les vaisseaux et le coeur. Cette étude s'inscrit dans la prévention, la prophylaxie, le diagnostic et le traitement des maladies liées à la calcification vasculaire chez l'homme.

**19982** En l'absence d'infection, le microbiote intestinal est impliqué dans la physiopathologie de maladies métaboliques telles que l'obésité, le diabète de type 2, l'athérosclérose et les maladies non alcooliques du foie. De nombreuses études montrent que certaines espèces bactériennes peuvent avoir un effet protecteur contre ces maladies, tout comme une dysbiose du microbiote peut quant à elle avoir un rôle délétère en provoquant ou accélérant le développement de ces maladies.

Nous savons aujourd'hui que quelques espèces bactériennes du microbiote ont un effet bénéfique sur la santé métabolique, par exemple *Akkermansia muciniphila* et *Anaerobutyricum soehngenii*. Chez la souris, ces bactéries réduisent la prise de poids sous régime hyper-lipidique et sont associées à un meilleur métabolisme glucidique. Chez l'Homme, il a été montré dans des essais cliniques de phase 1 que l'administration de ces bactéries permettait une perte de poids faible mais significative et qu'elles diminuaient la glycémie et le taux de cholestérol. Néanmoins, le microbiote est constitué de centaines d'autres d'espèces bactériennes dont le rôle est encore inconnu.

Nous avons analysé la composition du microbiote intestinal de patients minces et de patients souffrant d'obésité (n=212) et nous avons constaté que l'abondance de l'espèce *Parasuterella secunda* était 4000 fois plus élevée chez les patients minces que chez les patients obèses. Nous avons également mesuré l'abondance de cette bactérie chez des souris sous régime normal (croquettes pour souris standard) et sous régime riche en lipides (croquettes pour souris de régime hyper-lipidique HFD). Les souris sous régime hyper lipidique sont devenues obèses et avaient 50 fois moins de *Parasuterella secunda* dans leur microbiote intestinal que les souris sous régime normal. L'abondance de cette bactérie dans le microbiote est donc corrélée négativement avec le poids aussi bien chez l'Homme que chez la souris. Néanmoins nous ne savons pas encore si l'abondance de *P secunda* a un effet sur le poids ou si c'est l'obésité et les changements physiologiques associés qui provoqueraient une diminution de l'abondance de *P secunda*.

L'objectif de notre projet est donc d'étudier les effets de l'administration de *P secunda* sur le poids et le développement d'altération métaboliques dans un contexte physiologique et dans un contexte d'obésité et d'altérations métaboliques. Pour cela, nous administrerons *P secunda* à des souris sous régime contrôle et sous régime hyper-lipidique et nous les comparerons à des souris ne recevant pas la bactérie. Pour cela, nous suivrons la prise alimentaire des souris, leur poids et nous mesurerons leur métabolisme glucidique en leur administrant du glucose ou de l'insuline et en mesurant leur glycémie au cours du temps avec des prises de sang. Nous évaluerons également leur résistance à l'insuline par mesure de la phosphorylation d'AKT (protéine kinase B). Au total, 80 animaux seront considérés pour cette étude, c'est-à-dire 10 par groupe.

Vis à vis de la règle des 3R, et notamment du remplacement, l'étude de l'écosystème microbien digestif et son impact sur les maladies métaboliques ne peuvent pas être réalisés *in vitro*. En effet, la majorité des bactéries digestives ne survivent pas en dehors de leur hôte, en l'occurrence la souris, ce qui nécessite le recours au modèle murin. Par ailleurs, ces bactéries fonctionnent en écosystème et interagissent entre elles pour produire des molécules ayant un impact sur le métabolisme de leur hôte, ce qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. De plus, les grandes fonctions systémiques (immunité, inflammation, flux de nutriments entre les organes) participent de manière très importante au développement des désordres métaboliques, qui ne saurait donc être évalué en

l'absence de ces systèmes. La souris est l'espèce choisie dans la majorité des études antérieures portant sur les maladies métaboliques. Les souris sont faciles à manipuler et les administrations orales bien maîtrisables ; de plus, la présence de notre établissement utilisateur sur le site nous permet d'utiliser ce modèle dans de bonnes conditions d'expérimentation.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le design expérimental présenté ci-dessus correspond au nombre minimal de groupes et de souris nécessaires afin d'obtenir des résultats scientifiquement pertinents et statistiquement fiables. 10 souris par groupe « traitement » est le nombre minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement fiables compte tenu de la variabilité interindividuelle des paramètres mesurés (poids, tolérance au glucose, sensibilité à l'insuline).

En ce qui concerne le raffinement du protocole, l'ensemble des manipulations effectuées sur les animaux sont de classe légère à modérée. Elles seront toutes exécutées par des personnes expérimentées et compétentes afin de réduire au maximum la durée, la sévérité et l'intensité de la douleur. Nous avons également choisi un matériel et des procédures adéquats pour limiter la douleur et le stress, avec en particulier l'utilisation des sondes de gavage en plastique fines et souples pour l'administration des suspensions de bactéries. Les souris seront anesthésiées par voie gazeuse avant leur euthanasie.

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). L'état général des souris sera vérifié une fois par jour afin de pouvoir intervenir si nécessaire. De plus, un laps de temps de minimum 1 semaine entre les actes expérimentaux de classe modérée sera respecté afin de laisser un temps de récupération aux animaux. Pour chaque souris une perte de poids de plus de 15% par rapport à leur poids maximal sera considéré comme point limite menant à l'arrêt de l'expérience sur cette souris.

**19983** La maladie de Huntington (MH) est une maladie neurodégénérative de l'adulte incurable à ce jour. D'origine génétique, sa prévalence est de l'ordre de 1/10000. Les symptômes associent mouvements involontaires, déficits cognitifs et troubles de la personnalité et s'expliquent par une atteinte préférentielle du striatum dans le cerveau. Une meilleure connaissance des mécanismes physiopathologiques, en particulier des mécanismes précoces, est nécessaire pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Nous avons récemment identifié un nouveau mécanisme impliqué dans le processus pathogénique de la maladie et cherchons à mieux caractériser et à valider sur le plan thérapeutique des acteurs clés de ce mécanisme. Dans ce but, nous voulons effectuer une étude préclinique à partir de modèles murins de la maladie de Huntington. Le but est d'administrer aux souris un inhibiteur d'histone méthylase afin de prévenir la dérégulation épigénétique dans la maladie de Huntington. Ce composé a déjà fait l'objet d'études précliniques chez la souris. Notamment, injecté par la voie intra-péritonéale de façon chronique, il permet de traiter des gliomes cérébraux. Dans notre étude, nous nous baserons sur les conditions d'administration utilisées pour cibler les gliomes cérébraux. A l'heure actuelle, ce projet ne peut ni être réalisé à l'aide de modèles cellulaires, ni être simulé par des techniques informatiques. Les souris modèles étudiées dans le cadre de ce projet, sont nées et élevées dans des élevages agréés. Prenant en compte la stratégie des 3R, nous réduirons le nombre de souris au minimum nécessaire de 580 souris en basant nos estimations sur des calculs de puissance, nous compléterons les études mécanistiques à l'aide de modèles cellulaires à des fins de remplacement et, dans une optique de raffinement, nous réduirons la durée de l'étude au minimum nécessaire et apporterons les soins appropriés pour optimiser le bien-être des animaux. Ce nombre de 580 (comprenant des groupes contrôles) a été déterminé en fonction des expériences à réaliser et des différents groupes expérimentaux requis pour pouvoir répondre à notre question scientifique. Ainsi, pour les études comportementales, compte tenu de la variabilité interindividuelle des facteurs mesurés (variabilité liée au sexe comprise), des groupes de 18 animaux sont nécessaires pour montrer des différences intergroupes significatives, alors que pour les analyses moléculaires et histologiques, la variabilité interindividuelle étant plus faible, des groupes de 10-12 animaux sont suffisants. Dans un souci de raffinement, les animaux seront utilisés

à un âge symptomatique précoce. 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. Des échelles cliniques journalières, un soutien nutritionnel et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des rongeurs.

**19984** L'objectif de ce projet est d'évaluer la réparation du nerf sciatique après section transversale ou ablation partielle chez le rat en utilisant des implants résorbables imprimés en 3D (sous forme de conduit ou « wrap ») ainsi qu'une colle chirurgicale biocompatible, pouvant ou non contenir des molécules thérapeutiques (dans l'implant ou dans la colle). Le dispositif comprenant l'implant et la colle est décrit ci-après par le terme « système de réparation ». Le but est, après avoir validé la reconstitution du nerf sciatique sur l'animal, de tester en clinique la reconstitution des nerfs après une lésion.

Après avoir caractérisé et évalué les implants, colles et molécules d'intérêt *ex vivo*, ils seront évalués *in vivo*. L'évaluation de la régénération du nerf se fera par l'analyse de ses propriétés fonctionnelles, par la mesure de l'influx nerveux (électrophysiologie), par la mesure du poids des muscles innervés par le nerf régénéré, ainsi que par l'analyse histopathologique du nerf (qualité du nerf réparé) et des muscles (réinnervation musculaire) d'intérêt. Les molécules thérapeutiques lorsque délivrées seront également quantifiées.

Afin de réaliser cet objectif, le rat a été choisi comme modèle expérimental pour sa pertinence. En effet, sa taille, comparée à celle de la souris, permet plus aisément de pratiquer un acte chirurgical sur le nerf sciatique et de produire des tailles de défauts nerveux plus représentatifs des cas cliniques chez l'homme. Deux souches de rats seront initialement comparées afin de déterminer l'espèce ayant le moins de complications dans le cadre de cette procédure expérimentale. Il s'agira d'une procédure expérimentale classique, dont les bases sont connues et publiées dans des revues spécialisées.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain :

1) Remplacement : Des études *ex vivo* ont déjà été réalisées. Malheureusement, ces études ne peuvent suffire car ces modèles ne permettent pas de mimer les propriétés biologiques et mécaniques des organes entiers. Le présent projet *in vivo* consiste donc à valider ces systèmes de réparation *in situ* et permettra leur développement optimal pour la clinique.

2) Réduction : le nombre d'animaux utilisé a été rationalisé au maximum tenant compte, des analyses statistiques qui seront effectuées. Les systèmes de réparation à étudier seront réduits par une série d'études effectuées au préalable sélectionnant les implants et colles les plus prometteurs (analyse des propriétés physico-chimiques, étude des capacités de polymérisation, caractérisation *ex vivo* des propriétés mécaniques et d'adhésion, tests d'utilisation *ex vivo* des implants avec des cliniciens, cinétique de relargage *in vitro* des molécules thérapeutiques, test des molécules thérapeutiques sur cellules, analyse *in vitro* de la toxicité des implants et colles).

3) Raffinement : Le nombre d'animaux par cage (2 animaux) respectera la législation sur la protection des animaux de laboratoire. Les rongeurs disposeront à volonté d'eau et d'aliments. Tous les animaux seront hébergés en portoirs ventilés et enrichis avec des maisons, des bâtons, du papier, des boules et/ou des os en plastique. La totalité des gestes expérimentaux seront pratiqués par du personnel qualifié. Les animaux recevront un traitement antalgique avant toute procédure chirurgicale qui se fera sous anesthésie générale. À la suite de la procédure chirurgicale, un traitement antalgique systématique sera administré. Les animaux seront observés au minimum une fois par jour afin d'évaluer de potentiels signes de mal-être. Un vétérinaire est joignable tous les jours si besoin. En cas de perte de poids notable, une supplémentation en nourriture gélatinée sera donnée. Si par la suite aucune amélioration n'est observée et s'il y a atteinte des points limites (variation relative du poids corporel supérieure ou égale à 20% par rapport au poids maximum mesuré ou dégradation de l'état général de l'animal), l'euthanasie de l'animal sera effectuée.

Les lignées de rats impliqués dans le projet seront Lewis et Wistar et le nombre maximum d'animaux utilisé sera de 4608.

**19985** Notre environnement social a un impact direct sur notre bien-être, nos émotions et influence grandement nos comportements. Des données récentes suggèrent même que l'isolement social est l'une des plus grandes menaces pour la santé mentale et l'espérance de vie humaine. La propagation soudaine de la COVID-19 nous a pourtant forcé à réduire drastiquement nos interactions sociales. Cette brusque réduction a déjà produit ses effets néfastes ; augmentation du taux de dépression, d'anxiété et de sentiment de mal-être. De plus, l'ampleur du confinement nous laisse craindre que ce ne soit que le début du développement de ces pathologies induites par l'isolement (PII). Cependant, le réseau neuronal impliqué dans l'intégration d'information sociale et dans les PII reste mal connu. Ainsi, en combinant l'utilisation d'outils récents d'imagerie calcique *in vivo*, des outils viraux et des comportements sophistiqués, ce projet vise à étudier le circuit cérébral impliqué dans les PII. En effet, ces outils de points nous permettront d'enregistrer l'activité des neurones des régions susmentionnées lorsque les souris effectueront des tests comportementaux et ainsi mieux comprendre comment l'isolement altère l'activité cérébrale, pour in fine engendrer les PII. De plus, nous souhaitons identifier les cibles moléculaires altérées par l'isolement social, au sein du circuit étudié. Ainsi, ce projet a le potentiel de révéler de nouvelles approches thérapeutiques afin de combattre une très probable vague de pathologies induites par l'isolement récent d'une grande partie de la population.

Pour cela, dans un premier temps, nous souhaitons développer au sein du laboratoire un modèle murin d'isolement social (IS). Ainsi, notre protocole vise à induire les conséquences émotionnelles de l'isolement ; i.e. anxiété, symptômes dépressifs (anhédonie, perte de motivation), mais également les perturbations des comportements alimentaires et des comportements d'addiction. Pour cela, des souris seront simplement isolées pendant 6 semaines et nous testerons leurs comportements anxieux et dépressifs à l'issue de cet isolement. Leurs comportements seront comparés à ceux de souris hébergées en groupes sociaux (5 par cage), d'âge et sexe similaires.

Une fois le modèle validé, nous utiliserons des approches immunohistochimiques, d'enregistrements calciques *in vivo* et de biologie moléculaire afin de décrire les altérations induites par l'isolement. Cette pluralité d'approches nous permettra 1) d'identifier les régions cérébrales altérées par l'IS ; 2) d'évaluer comment ces altérations influencent les comportements anxieux et dépressifs ; 3) d'identifier les altérations moléculaires, au sein du réseau cérébral affecté par l'IS.

Enfin, une fois toute cette caractérisation effectuée, nous souhaitons manipuler les structures responsables des PII afin de reverser ou d'exacerber les effets de l'IS. Lors de ces manipulations, nous chercherons également à sur-exprimer ou réprimer l'expression de gènes cibles identifiés lors de la caractérisation moléculaire du modèle. Cette dernière partie du projet devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réduire les symptômes induits par l'IS.

Le projet nécessitera 870 animaux (850 animaux pour le projet et 20 pour l'étude pilote) et sera conduit en respectant la règle des 3R visant à réduire le nombre d'animaux ainsi qu'à optimiser les procédures.

Remplacer : Au vu de notre thématique d'étude, il nous est impossible de remplacer notre modèle *in vivo* par un modèle *in vitro* ou *in silico*. La caractérisation des altérations émotionnelles et affectives induites par l'isolement social nécessite une observation comportementale, uniquement possible chez l'animal vivant et vigile.

Réduire : les expériences seront cependant réalisées avec la volonté de réduire au minimum le nombre d'animaux par condition expérimentale, mais toujours dans l'optique d'obtenir le maximum d'information scientifique par test. Ainsi, au regard des données de la littérature et de la variabilité phénotypique individuelle, les groupes expérimentaux explorant les comportements de type anxiodépressif seront constitués de 15 souris par groupe. Toujours dans l'idée de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés certaines des procédures expérimentales feront partie d'un enchaînement et utiliseront les mêmes animaux, ce qui en réduira grandement l'effectif. Pour cette raison une même cohorte d'animaux sera étudiée et caractérisée au niveau comportemental et émotionnel, puis fera l'objet d'investigations moléculaires et/ou d'imagerie (immunohistochimie ou IRM).



Raffiner : Les animaux sont hébergés en animalerie où la température, l'humidité et le cycle jour/nuit sont contrôlés et avec un accès ad libitum à la nourriture et boisson. Les groupes témoins seront hébergés en cohorte de 5 individus pour respecter leurs besoins sociaux. En revanche, les animaux tests seront quant à eux seul dans leur cage. Des carrés de coton seront placés dans la cage pour favoriser la nidation, et des barreaux de bois à ronger pour limiter les comportements d'agressivité. Nous travaillerons en cycle jour/nuit inversé (lumière allumée de 21h à 9h), pour éviter les manipulations durant le temps de sommeil des animaux et ainsi diminuer le stress. Les animaux seront observés tous les jours et leur comportement sera suivi afin de déceler tout signe d'inconfort ou de stress. Les procédures invasives seront réalisées sous anesthésie et analgésie pré-, per- et post-opératoire. La température corporelle de l'animal sera maintenue grâce à un tapis chauffant thermostaté tout au long de la procédure. La douleur sera évaluée en post-opératoire grâce à une fiche d'évaluation objectivée permettant d'identifier des points limites parfaitement adaptés qui permettront d'interrompre la procédure pour limiter la souffrance animale. En cas de signes de souffrance de l'animal, des soins, une administration d'antalgique ou d'anti-inflammatoire, une séparation (blessures entre congénères) seront réalisés après concertation avec le vétérinaire et/ou la Structure chargée du Bien-Etre des Animaux.

**19986** Ce projet fait l'objet d'une réévaluation ayant été approuvé en 2016.

La cystite interstitielle (CI), ou syndrome de la vessie douloureuse, est une affection urologique très invalidante. Maladie chronique inflammatoire mais non infectieuse, la CI touche principalement les femmes. Elle provoque d'intenses douleurs dans le bas ventre ainsi que des mictions fréquentes et urgentes de jour comme de nuit. Aujourd'hui, les causes précises et la physiopathologie de la CI ne sont pas connues, cette pathologie étant considérée comme multifactorielle. Actuellement, les traitements diminuent l'intensité des symptômes et leur impact sur la qualité de vie des patients mais ne permettent pas de soigner la pathologie.

Expérimentalement, deux modèles de cystite sont utilisés chez le rongeur :

- Modèle aigu (jusqu'à 48 heures de temps)
- Modèle chronique (jusqu'à 3 semaines).

Ils sont caractérisés par une augmentation du nombre de mictions, une inflammation et une douleur vésicale. De ce fait, ces modèles regroupent les 3 symptômes caractéristiques de la CI et sont considérés comme des modèles de référence pour tester des candidats médicaments pour le traitement de la CI.

L'objectif de cette étude sera d'étudier d'une part l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques et d'autre part, l'implication de gènes-cibles (évaluation de la douleur et/ou de la fonction vésicale) chez la souris.

Afin de répondre à cet objectif, le nombre d'animaux utilisés sera de 1 512 à raison de 12 animaux par groupe, le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation qui nous permet de mesurer la valeur basale de chaque animal. Ainsi, chaque animal est son propre contrôle ce qui permet de réduire le nombre d'animaux et donc de répondre aux exigences de la réduction de la règle des 3-R. De plus, conformément à la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux (igloos, carrés de coton, aspen brick). Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé quotidiennement, le suivi étant assuré par les zootechniciens certifiés de l'animalerie. Un enrichissement (type aspen brick ou igloo en polycarbonate, nestlets) sera ajouté dans les cages d'hébergement permettant ainsi de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, ce qui répond aux exigences de raffinement dans les règles des 3-R. De plus, pour affiner ce paramètre de raffinement, des points limites évoqués dans chaque procédure seront établis et si ces derniers étaient atteints, l'euthanasie de l'animal serait réalisée pour éviter toute souffrance. L'utilisation de techniques non-invasives (technique de von Frey et de cage à métabolisme) permet d'observer au cours du temps la réponse douloureuse ou mictionnelle d'un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie de multiples individus à chaque

stade d'une seule étude. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Aujourd'hui, il n'existe pas de thérapie pharmacologique efficace pour traiter la cystite et aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* ne peut mimer la pathologie dans son ensemble et dans sa complexité.

Ces limitations rendent incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouveaux candidats médicaments.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R.

Ce projet bénéficiera d'une évaluation rétrospective à l'issue de sa réalisation puisqu'il contient une procédure classée sévère.

**19987** Selon les données de l'IARC (International Agency for Research on Cancer), on estime qu'en 2020, l'incidence mondiale (nouveaux cas diagnostiqués) du cancer est d'environ 18,6 (18 à 19.4) millions et que sa prévalence mondiale (personnes atteintes et vivantes) à 5 ans est d'environ 44 millions. Ces chiffres en constante hausse inquiète l'organisation mondiale de la santé (OMS) d'autant plus qu'avec l'augmentation et le vieillissement de la population, les projections sont inquiétantes.

De nouvelles thérapies ont vu le jour comme l'immunothérapie. Cette approche a prouvé son efficacité notamment dans le traitement des cancers agressifs de la peau. Malgré ces avancées, de nombreux cancers ne connaissent toujours pas de traitement efficace, et le cancer reste la seconde cause de mortalité après les maladies cérébro-vasculaires. Il a entraîné, en 2015, 8.8 millions de décès, soit 17 % de l'ensemble des décès.

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. Ces limitations rendent donc incontournable le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles thérapies.

L'objectif de cette étude est d'évaluer de nouvelles molécules anticancéreuses (notamment des immunothérapies) dans des modèles de cancer sous-cutanés chez le rongeur (rat/souris). Le modèle sous cutané n'induit pas de développement métastatique et est donc moins représentatif de la physiopathologie humaine mais c'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.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet est de 3 750 souris et 750 rats sur 5 ans 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.

Les injections de cellules tumorales en sous-cutanées seront réalisées sous anesthésie générale (anesthésie gazeuse). La croissance tumorale sera suivie au cours du temps par mesure au pied à coulisse sur animal vigile. L'utilisation de cette technique non-invasive permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par l'euthanasie et l'autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à l'espèce sera ajouté aux animaux (carrés de coton, aspen brick, des tunnels, des igloos...). 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 par du personnel qualifié, des points limites adaptés seront définis (cf ci-dessous) sans pour autant oublier le critère d'intérêt qui est l'évolution d'une tumeur. Nous avons établi des points d'intervention afin de limiter la douleur à son minimum :

- Addition d'Aspen brick et d'igloos en cas de bagarres entre animaux et séparation du dominant pendant quelques jours si nécessaires,
- Mesure du poids des animaux toutes les semaines,
- Arrêt des traitements en cas de perte de poids  $\geq 20\%$  du poids initial.

Nous avons établi des critères qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de s'alimenter, se mouvoir...),
- Présence d'une souffrance/douleur (vocalisation, perte d'appétit, piloérection, prostration...),
- Perte de poids  $\geq 20\%$  du poids initial sur 72h,
- Ulcération tumorale,
- Volume tumoral excédant 10% du poids de l'animal correspondant typiquement à un diamètre de 17 mm pour une souris ou 35 mm pour un rat. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

**19988** Chez la femme, le cancer du sein représente une cause de mortalité importante. Aujourd'hui, grâce aux nouvelles approches thérapeutiques, plus de 80% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont une espérance de survie supérieure à 5 ans. Cet allongement a été rendu possible par le recours aux traitements multiples (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, thérapie ciblée et immunothérapie) et à la prise en charge plus précoce de cette pathologie.

Cependant, de nombreuses patientes ne répondent pas à leurs traitements. Le cancer du sein fait donc l'objet d'intenses recherches à l'heure actuelle. Dans ce cadre, il est essentiel d'apporter aux scientifiques un modèle d'étude de cette pathologie permettant de mimer au mieux son développement et de tester de nouvelles approches thérapeutiques. En greffant des cellules tumorales dans les glandes mammaires murines, nous reproduisons le cancer du sein en permettant d'étudier le développement des cellules cancéreuses au site primaire, mais également d'observer la dissémination des cellules cancéreuses en métastases.

Dans le cadre de ce projet, des souris au système immunitaire humanisé (Hu-NCG et Hu-NOG) et non-humanisées (NCG, NOG, NSG, BRG, Nod/Scid, C57Bl/6, BALB/c) recevront une greffe de cellules issues d'une lignée tumorale ou de Patient-Derived Xenografts (PDX) par voie sous-cutanée au niveau de la glande mammaire. Après croissance de la tumeur, la souris recevra des composés de recherche par voie entérale (gavage, incorporation dans l'alimentation) ou parentérale (veineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intra-musculaire). La fréquence et les volumes d'administration autorisés seront déterminés par le vétérinaire d'établissement et validé par le comité de bien-être.

Afin de suivre l'évolution de la pathologie et d'objectiver les effets des molécules à visée thérapeutique, des prises de sang seront réalisées au niveau du sinus rétro-orbital, de la veine saphène ou dans la veine caudale. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront réalisés sous anesthésie générale. La fréquence et les volumes de prélèvements autorisés seront déterminés par le vétérinaire d'établissement et validé par le comité de bien-être. A titre d'exemple, 200  $\mu\text{L}$  de sang pourront être collectés sur une période de deux semaines pour une souris de 25 gr. Si un volume supérieur à 200  $\mu\text{L}$  est nécessaire en une seule prise, une ponction intracardiaque terminale sera également autorisée, sous anesthésie générale et sans réveil de l'animal.

Les animaux seront observés tous les jours afin de monitorer leur état de santé. Leur potentiel état de souffrance sera objectivé par une échelle de scoring prenant en compte l'état du pelage, les mouvements, l'activité, la couleur des muqueuses et le score corporel. Une souris avec un score supérieur  $\geq 7$  devra être euthanasiée pour raison éthique. Le poids et le volume tumoral seront monitorés trois fois par semaine, ces suivis pourront être adaptés au stade de l'étude. Une perte de plus de 25% du poids mesuré le plus élevé ou un volume tumoral supérieur à 1500  $\text{mm}^3$  sera considéré comme une raison de mise à mort. Toute anomalie devra être rapportée au vétérinaire

d'établissement qui aura pleine autorité pour mettre en place un traitement anti-douleur ou euthanasier un animal si elle/il le juge nécessaire.

#### REDUCTION:

Un total de 10000 souris adultes humanisées seront utilisées, couvrant une période 5 ans, permettant de développer le modèle et des réaliser des tests précliniques pour 330 études. 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 d'animaux utilisés dans chaque étude sera réduit au maximum en se basant sur des tests statistiques prenant en compte les effets attendus de la série.

#### 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. Les souris recevront 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 clinique adaptée aux études en immuno-oncologie.

#### REMPACEMENT:

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 le cancer de sein, et de mimer l'interaction entre la tumeur et l'organisme, tout en objectivant les effets potentiellement toxiques d'une molécule en développement. La souris constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement et la mise au point de traitements innovants pour des pathologies cancéreuses.

**19989** Des millions d'êtres humains souffrent de pathologies psychiatriques telles que la dépression ou l'anxiété. Ces pathologies sont fréquemment associées à des troubles du sommeil et en particulier à l'insomnie. Ces troubles de l'humeur ou du sommeil sont précipités par le stress. Les effets du stress peuvent être modélisés chez l'animal. En particulier, le stress de défaite sociale induit des modifications comportementales qui évoquent la dépression et l'insomnie. Le striatum semble être une région clé pour médier les effets de ce stress.

Dans ce cadre, notre projet de recherche vise à étudier le rôle d'une population de neurones glutamatergiques sur la régulation du sommeil et des comportements émotionnels en réponse au stress de défaite sociale. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des modèles murins. En effet, les souris génétiquement modifiées permettent d'étudier le rôle de gènes particuliers ou d'une population de neurones dans la physiopathologie des troubles psychiatriques et des anomalies du sommeil qui les accompagne. En particulier, des souris mutantes seront étudiées par des approches associant génétique, comportement et physiologie.

Au total, ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 1576 souris sur une période de 5 ans.

La règle des 3R a été considérée tout au long de l'élaboration de ce projet et sera appliquée au quotidien.

Le remplacement des animaux par des méthodes alternatives n'est pas à l'heure actuelle possible. Vu la nature de nos recherches, l'utilisation de rongeurs reste nécessaire pour l'étude de fonctions intégrées comme le sommeil ou les comportements émotionnels. Nous serons néanmoins vigilants quant au développement de méthodes alternatives pendant la durée de ce projet. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés, le design des expériences comportementales et des expériences de physiologie a été calculé au plus juste, en tenant compte de la puissance des analyses statistiques et de nos expériences précédentes. Le raffinement des méthodes

expérimentales visant à réduire à son maximum la souffrance animale est mise en oeuvre grâce à l'utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques appropriés lors de chirurgies, à la mise en place de soins post-opératoires et de points limites clairement établis. L'ensemble des expériences seront menées par des personnes compétentes. Pour toute cette étude, les animaux seront hébergés avec un cycle jour/nuit adapté et avec boisson et nourriture ad libitum dans un environnement enrichi.

**19990** Le Solriamfetol est une nouvelle molécule qui constitue une alternative pharmacologique aux autres traitements de la narcolepsie déjà sur le marché. Le présent projet de recherche a pour but d'identifier les neurones responsables de l'induction d'éveil par cette substance. Ce type d'information constitue une information importante dans le cadre de son utilisation. Pour ce faire, nous utiliserons une souche de souris génétiquement modifiée (TRAP2-RED) innovante qui permet de visualiser les neurones activés lors de deux conditions expérimentales différentes. Les neurones activés expriment la protéine tdTomato (marqueur rouge) dans leurs cytoplasmes lors d'un premier éveil et la protéine cFos lors d'un deuxième éveil induit une semaine après. Ce modèle nous permettra de déterminer si les mêmes populations de neurones induisent l'éveil naturel et celui induit par le Solriamfetol et le Modafinil.

A la suite de l'identification des populations de neurones responsables de l'éveil induit par le Solriamfetol (procédure 1), nous démontrerons le rôle de ces neurones dans l'induction de l'éveil en les inhibant à l'aide de récepteurs inhibiteurs transfectés au préalable (procédure 2). La méthode utilisée est la technique DREADD maintenant bien répandue dans la littérature scientifique.

Ce projet de recherche fondamentale, réalisé sur 24 mois, prévoit l'utilisation de 76 souris TRAP2-RED, composé de 6 lots expérimentaux répartis en deux procédures de classe modérée :

Procédure 1 : Cette procédure nous permettra d'identifier les populations neuronales activées par un éveil naturel versus celles activées par l'administration de deux substances pharmacologiques inductrices d'éveil. Du fait de l'implantation des électrodes pour l'étude de l'activité cérébrale, nous anticipons une perte de poids les jours suivants la chirurgie, toutefois, les animaux normalement récupèrent leur poids initial en moins d'une semaine. Après la période de récupération post-chirurgicale d'une semaine et la phase d'habituation au dispositif d'enregistrement (3 jours), nous commencerons les manipulations expérimentales proprement dites. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de vérifier leurs états de santé et de fournir, si besoin, une médication pour assurer leur bien-être. Dans un premier temps, afin d'induire l'état d'éveil les animaux recevront une administration intrapéritonéale de Solriamfetol ou de Modafinil (éveil induit pharmacologiquement) ou seront mis dans le champ ouvert en présence d'une autre souris et avec de l'eau/nourriture ad libitum (éveil naturel). Deux heures après le début des enregistrements de sommeil et d'éveil par EEG et EMG (études polysomnographiques), tous les animaux recevront une injection intrapéritonéale du 4-OHT, ce qui permettra, par l'expression de la protéine tdTomato, d'identifier les différentes populations de neurones activés pendant l'éveil induit pharmacologiquement ou naturellement. Ces protocoles seront répétés 1 semaine après, puis les animaux seront perfusés pour prélever le cerveau et, réaliser par la suite, les analyses immunohistochimiques.

Procédure 2 : Cette procédure a pour but de déterminer l'effet sur l'induction d'éveil de l'inactivation d'une population de neurones identifiée dans la procédure 1. En vue d'obtenir un contrôle spécifique d'une population neuronale, des récepteurs inhibiteurs sont transfectés spécifiquement dans ces neurones à l'aide des vecteurs viraux. Ces neurones sont ensuite ultérieurement inhibés en injectant intrapéritonealement le CNO qui est le ligand du récepteur inhibiteur. Ainsi, nous pourrions évaluer la contribution de cette structure dans la genèse et la maintenance de l'état d'éveil naturel ou induit par le Solriamfetol. Dans un premier temps, nous implanterons des électrodes de polysomnographie. Ensuite, nous réaliserons la transfection des vecteurs viraux, ciblant la zone cérébrale d'intérêt. La transfection virale de la zone d'intérêt sera effective 3 semaines post-chirurgie. À ce moment, les animaux seront habitués à leurs caissons pour les enregistrements polysomnographiques puis nous induirons un éveil par l'administration de Solriamfetol suivi par une injection de 4-OHT. Par la suite nous inhiberons l'activité cérébrale de la région d'intérêt avant

l'administration du Solriamfetol ou du Modafinil afin d'évaluer la contribution de cette zone à l'état d'éveil naturel ou induit pharmacologiquement. Les animaux seront ensuite perfusés et leurs cerveaux prélevés afin d'effectuer les analyses immunohistochimiques.

Exigences des 3R :

**Remplacement** : Cette étude ne peut être conduite sur des animaux de niveau phylogénétique inférieur (mouche, poisson rouge). La neuro-imagerie humaine, la modélisation *in silico* ou les cultures cellulaires ne constituent pas encore d'alternatives crédibles au modèle rongeur pour l'étude de mécanismes cellulaires. C'est pourquoi nous profiterons des avantages que procure l'utilisation de souris génétiquement modifiées afin d'analyser ces processus neurobiologiques complexes.

**Réduction** : La taille des lots expérimentaux de souris a été calculée au plus juste à partir de nos études antérieures utilisant les mêmes tests comportementaux dans le but de générer des données reproductibles dont la significativité sera validée par les tests statistiques adaptés. Elle tient donc compte des « erreurs et échecs » qui peuvent survenir à chaque étape de la procédure expérimentale depuis la préparation des animaux sous anesthésie mais aussi lors des tests expérimentaux pour lesquels il est connu qu'un nombre non négligeable d'animaux ne répondent pas de manière satisfaisante, nécessitant de facto leur retrait des échantillons expérimentaux.

**Raffinement** : La souris TRAP2-RED constitue actuellement l'état de l'art dans l'ingénierie génétique développée pour l'identification de populations neuronales activées à un instant donné. Afin de garantir les meilleures conditions d'hébergement, 3 ou 4 animaux seront hébergés par cage afin de permettre leurs interactions. Des enrichissements systématiques seront mis en place afin de permettre une augmentation autant que possible du bien-être de l'animal. Les conditions d'élevage, de soins post-opératoires, d'hébergement et les différentes étapes de la procédure expérimentale sont maîtrisées afin de réduire/supprimer de possibles conditions de détresse. Nous avons également fixé des critères d'interruption des expérimentations et d'exclusion (douleur, souffrance physique, agressivité, perte de poids) estimés grâce à une grille d'évaluation individuelle.

**19991** Selon les données de l'IARC (International Agency of Research on Cancer), on estime qu'en 2020, l'incidence mondiale (nouveaux cas diagnostiqués) du cancer est d'environ 18,6 (18 à 19.4) millions et que sa prévalence mondiale (personnes atteintes et vivantes) à 5 ans est d'environ 44 millions. De nouvelles thérapies ont vu le jour comme l'immunothérapie. Cette approche a prouvé son efficacité notamment dans le traitement des cancers agressifs de la peau. Le cancer a entraîné, en 2015, 8.8 millions de décès, soit 17 % de l'ensemble des décès.

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 incontournable le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles thérapies.

L'objectif de cette étude est d'évaluer de nouvelles molécules anticancéreuses (notamment des immunothérapies) dans des modèles de cancer orthotopiques chez le rongeur (rat/souris). Le modèle orthotopique qui consiste en une implantation tumorale au niveau de son site anatomique d'origine 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...) de manière spontanée. Ce modèle plus sévère est néanmoins plus proche de la physiopathologie cancéreuse et est donc plus prédictif.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet est de 4 500 souris et 1 200 rats sur 5 ans en raison de 12 animaux par groupe en moyenne (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats

statistiquement significatifs), le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Les injections de cellules tumorales seront réalisées sous anesthésie générale (anesthésie gazeuse ou par injection d'un mélange kétamine/xylazine). La croissance tumorale sera suivie au cours du temps par bioluminescence sur animal anesthésié. L'utilisation de cette technique non-invasive permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par l'euthanasie et l'autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux.

Nous avons établi des critères qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire (sacrifice de l'animal) :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de se nourrir, de s'alimenter...),
- Présence d'une souffrance/douleur (vocalisation, perte d'appétit, poil hérissé, prostration...),
- Perte de poids  $\geq 20\%$  du poids initial sur 72h (au cours des 72h, administration de saline si besoin pour réhydrater l'animal et observation de son état général 2 fois par jour)

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement adapté à l'espèce sera ajouté aux animaux (carrés de coton, aspen brick, des tunnels, igloos...). 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 quotidiennement par du personnel qualifié. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement). Ce projet bénéficiera d'une évaluation rétrospective à l'issue de sa réalisation puisqu'il contient une procédure classée sévère.

**19992** Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. La complication majeure de ce traitement est l'apparition d'une réponse immunitaire anti-FVIII qui neutralisent le FVIII thérapeutique. La seule approche permettant une éradication des IgG anti-FVIII consiste en l'injection quotidienne de fortes doses de FVIII sur des périodes pouvant atteindre plusieurs mois à plusieurs années. Outre son coût (supérieur à 200 k€ par an et par patient) et son extrême lourdeur, ce traitement, appelé « Induction de Tolérance Immunitaire » (ITI), n'est efficace que chez 60 à 80% des patients. L'apparition d'IgG anti-FVIII représente donc une impasse clinique et un problème sociétal majeur.

Plusieurs stratégies destinées à induire une tolérance au FVIII thérapeutique ont été développées chez la souris déficiente en FVIII. Il a ainsi été démontré que le transfert materno-foetal des domaines immuno-dominants du FVIII couplés au domaine Fc de l'IgG1, protège partiellement les souriceaux du développement d'une réponse allo-immune dirigée contre le FVIII thérapeutique à l'âge adulte. Notre hypothèse est que la protection était partielle car toute la molécule de FVIII n'avait pas été utilisée mais seulement les domaines A2 et C2 qui représentent 30% de la taille de la protéine. Ici, notre objectif est d'optimiser cette approche de manière à ce qu'elle soit directement applicable chez l'homme et confère une protection complète. Récemment, nous avons évalué la capacité du FVIII entier fusionné au Fc de l'IgG1 humaine à traverser le placenta et à induire une tolérance immunitaire au FVIII. Nos résultats ont montré que le FVIII-Fc est transféré à des niveaux très faibles comparés à une IgG1 humaine ou au domaine C2 fusionné au Fc de l'IgG1. L'objectif ici est d'évaluer la capacité de différentes constructions chimériques du FVIII fusionné au Fc à traverser la barrière placentaire et induire une tolérance immunitaire complète au FVIII (si les taux de passage transplacentaire sont jugés suffisants).

Le nombre total maximal de souris estimé sur la base de prédictions statistiques pour ce projet est de 1449 souris.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R :

Remplacement : En parallèle, nous évaluons des systèmes *in vitro* afin de tester les capacités de nos molécules à traverser la barrière transplacentaire et ainsi de limiter le nombre de molécules à tester *in vivo*. Le projet fera donc appel à différents modèles expérimentaux *in vitro* et chez la souris.

En effet, seule une approche expérimentale *in vivo* permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques (notamment le passage trans-placentaire et l'induction de tolérance immunitaire).

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 euthanasiées 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). Les gestes susceptibles d'entraîner une douleur seront réalisés sous anesthésie gazeuse.

**19993** Le diabète de type II est l'une des maladies métaboliques les plus répandues dans les pays développés et apparaît en général après 40 ans. Avec la progression de la pathologie, de nombreuses complications font leur apparition sur le long terme, dont les plus importantes sont des atteintes cardiovasculaires et rénales.

Concernant les complications rénales, plus de 40% des patients diabétiques développeront au cours de leur vie une néphropathie diabétique. Cette pathologie est caractérisée par une albuminurie (présence d'albumine dans les urines) et un déclin de la fonction rénale. Au stade le plus avancé de la pathologie, le recours à la dialyse s'avère nécessaire et une greffe d'organe est souvent proposée.

Les mécanismes et systèmes impliqués dans la néphropathie ne restent pas à ce jour complètement connus et les traitements pharmacologiques utilisés ne permettent pas sa rémission. Chez les patients atteints de néphropathie diabétique, une augmentation de la pression intra-rénale participe à la progression de la maladie. Les techniques alternatives *in vitro* et *ex vivo* ne permettent pas à ce jour d'étudier dans son ensemble la néphropathie diabétique ; c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animal est nécessaire.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur le développement de la néphropathie induite par un diabète de type II, afin d'identifier une thérapie efficace pour prévenir et/ou traiter cette pathologie. Les modèles principaux choisis pour cette étude sont des modèles murins génétiquement modifiés (souris db/db et BTBR ob/ob) qui développent un diabète de type II et une néphropathie de manière spontanée aux caractéristiques proches de la pathologie humaine. Cependant, ce protocole pourra être adapté chez le rat avec le modèle des rats Zucker ZDF par exemple qui développent également un diabète de type 2.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 300 souris et 300 rats à raison de 12 animaux par groupe. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours. 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.

En accord avec la réglementation, nous avons établi une stratégie d'expérimentation permettant 1) de réduire le nombre d'animaux utilisés, grâce à une méthode de mesure de la fonction rénale non invasive afin de maintenir en vie les animaux pendant toute la durée de l'expérimentation, 2) de raffiner : 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 de l'hébergement (type igloo en polycarbonate, tunnel, aspen brick, nestlet) sera introduit auprès de



ces derniers. De plus, durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours par du personnel compétent. Ces méthodes non invasives nous permettront de mesurer des biomarqueurs d'intérêt pour cette pathologie et/ou d'en identifier de nouveaux pouvant prédire son évolution. Aucune méthode de remplacement permettant de mimer une néphropathie diabétique, n'existe malheureusement à ce jour *in vitro*. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle des 3-R.

De plus, ce projet fait l'objet à ce jour d'une réévaluation ayant été approuvé en 2016 avec l'ajout d'une procédure (procédure n° 4) et l'adaptation possible de ce protocole chez le rat.

**19994** Les maladies allergiques respiratoires (p.ex., l'asthme allergique) ou alimentaires sont en plein essor dans les pays développés. Il est maintenant estimé qu'un tiers des Français souffrent d'une ou plusieurs formes de maladies allergiques, dont certaines peuvent s'avérer fatales (p.ex., certaines formes d'asthmes réfractaires aux corticoïdes ou encore des chocs anaphylactiques induits par l'ingestion de cacahuètes).

L'origine des diverses maladies allergiques chez l'Homme est extrêmement complexe et plusieurs facteurs (p.ex., immunologique, génétique, environnemental et neuronal) sont suspectés d'être impliqués dans leur développement.

Ce programme de recherche a pour but de développer de nouvelles approches thérapeutiques dans les pathologies allergiques. Il sera réalisé dans le strict respect de la règle des « 3R » :

« Réduire » : Nous estimons devoir utiliser 816 souris sur les 5 années que durera ce projet. Ce nombre inclut le nombre minimum nécessaire de contrôles et la nécessité de reproduire les résultats, en respect avec la règle des 3R, et calculé au plus juste sur la base des données de la littérature et d'études antérieures. Le calcul du nombre minimal d'animaux par groupe a été fait sur la base de notre expérience antérieure avec les modèles d'allergie et des tests statistiques effectués lors de ces études antérieures.

« Raffiner » : Les animaux seront hébergés dans un environnement qui répond à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. Une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. De plus, toutes les manipulations qui pourraient être douloureuses ou stressantes pour l'animal seront systématiquement réalisées sous anesthésie. Les animaux seront observés quotidiennement, bien que nous n'anticipions pas d'apparition de signes de douleur dans nos modèles d'allergie. Tout animal présentant une douleur évidente (isolement, baisse importante de l'activité, perte de poids > 20%, pilo-érection) sera immédiatement mis à mort.

« Remplacer » : Devant la complexité de ces maladies, due notamment à l'implication de différents organes et types cellulaires, le recours aux modèles animaux est indispensable. L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire.

Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser visent à mieux comprendre le développement des maladies allergiques et à identifier de nouvelles stratégies pour prévenir et soigner ces maladies.

**19995** 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 de telles approches dans l'élevage des poissons constitue maintenant un enjeu important. L'enjeu est non seulement en termes de suivi fin de l'état de santé des animaux mais aussi pour favoriser le développement de conditions plus éthiques en expérimentation animale (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. Chez la truite, suite à des premiers tests concluants réalisés au printemps 2019 et à l'automne 2020, nous envisageons dans la présente demande d'utiliser cette technique pour comparer dans deux lignées isogéniques de truite arc-en-ciel les réponses à un stress aigu d'hypoxie. Les deux lignées seront choisies sur leurs caractéristiques divergentes pour la réponse à un stress aigu de confinement.

Ce projet requiert une procédure soumise à autorisation :

- Etude des effets d'un stress aigu d'hypoxie chez des truites arc-en-ciel équipées de biosenseurs : 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). Nous mesurerons également les paramètres de l'eau : oxygène, ammoniac, CO<sub>2</sub>.

Nous utiliserons des truites de poids moyen ~800g et pour chacune des 2 lignées nous aurons 10 poissons témoins qui resteront en normoxie et 10 poissons qui recevront un stress hypoxique aigu de deux heures. Au total, 40 poissons seront équipés d'un biosenseur fixé sur l'opercule. Afin de pouvoir les suivre individuellement, ces 40 poissons seront préalablement marqués individuellement par pit-tag. Pour avoir une densité optimale dans nos bacs expérimentaux (25 kg/m<sup>3</sup>), nous rajouterons des truites non traités (n= 80) pour avoir au total 120 poissons concernés par cette demande.

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 l'effet d'un stress aigu d'hypoxie sur les paramètres fournis par des biosenseurs.

- 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 : 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.

**19996** L'épilepsie du nourrisson avec crises focales migratoires (EIMFS), également connue sous le nom de crises partielles migratoires de la petite enfance, appartient à un groupe de syndromes épileptiques rares. Il se caractérise par l'apparition de crises d'épilepsie avant l'âge de 6 mois, le déclin du développement psychomoteur, un taux de mortalité élevé et un électroencéphalogramme présentant un schéma spécifique avec des décharges multifocales migrantes. Cette épilepsie affecte autant les hommes que les femmes, et la plupart des patients ne répondent pas à plusieurs antiépileptiques. Jusqu'à présent, l'apparition de l'EIMFS a été associée à des mutations dans certains gènes, mais le fond génétique de la maladie reste encore flou. Ces dernières années, l'extension de la technique du séquençage de l'exome complet (WES) a permis l'identification de nouveaux variants du gène SLC12A5 - qui code le co-transporteur de chlorure de potassium neuronal KCC2 - associé à l'EIMFS. Les variants de ce gène sont soupçonnés d'avoir un fort potentiel de dysfonctionnement neurodéveloppemental.

KCC2 participe à de nombreux mécanismes neuronaux très importants pour l'établissement des connexions entre neurones au cours du développement, et pour la communication neuronale par la suite. KCC2 est crucial pour maintenir la balance excitation-inhibition dans les neurones. On pense que la perturbation de cet équilibre est à la base de nombreuses pathologies du système nerveux central, y compris l'épilepsie.

Un modèle de mutation spontanée dans le gène SLC12A5 s'est produite au moment de la révalidation de la lignée Fmr1-KO qui induit un phénotype caractérisé par les crises épileptiques

spontanée après 4 à 6 mois de vie aussi chez les souris qui ne sont pas porteuses de la mutation dans le gène *Fmr1*. Ceci indique l'indépendance des deux phénotypes. Toutefois puisque la mutation dans le gène *SLC12A5* a été identifiée aussi chez des patients atteints de syndrome du spectre autistique, schizophrénie et, naturellement, épilepsie, nous avons décidé de continuer la caractérisation de ce modèle animal. Il existe un modèle KO de *KCC2*, c'est-à-dire dans lequel le gène est totalement inactivé et la protéine *KCC2* absente, pour lequel les animaux homozygotes ne survivent pas, et les hétérozygotes n'ont pas de phénotype évident. D'autre part, la plupart des modèles murins pour l'épilepsie ne présentent de crises qu'après une induction chimique ou thermique. Ce modèle présentant une épilepsie spontanée est donc un outil unique et important pour mieux comprendre la physiopathologie des EIMFS.

Pour ce projet, nous utiliserons un nombre maximal de 1048 souris sur 5 ans, soit au maximum 210 souris par an.

Réduction : Nous avons calculé le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Lorsque cela est possible sans risque d'interférence entre les différents tests, nous réaliserons plusieurs tests de comportement sur les mêmes animaux. Enfin, les animaux utilisés pour le comportement seront sacrifiés à l'issue des procédures et leurs organes prélevés pour réaliser l'étude moléculaire, biochimique et histologique de ce nouveau modèle.

Remplacement : En parallèle de notre caractérisation de ce nouveau modèle d'étude pour l'épilepsie, nous allons établir une lignée cellulaire capable de se différencier en neurones grâce à la technique des ciseaux moléculaires *Crispr-Cas9* avec la mutation identifiée chez les souris, afin de pouvoir étudier un certain nombre de paramètres *in vitro*.

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupes sociaux adaptés à leur fonctionnement social et disposent d'éléments d'enrichissement (cabanes, bâtons à ronger, ouate). De plus, un examen régulier par les expérimentateurs et le personnel animalier permet de détecter rapidement un comportement anormal ou un mal-être et de prendre les mesures adaptées : euthanasie en cas de souffrance, ou soin adapté et séparation en cas de blessure par un animal dominant.

L'objectif du projet est de caractériser ce nouveau modèle d'étude afin de le mettre à disposition de la communauté scientifique pour mieux comprendre et essayer de traiter cette forme d'épilepsie.

- 19997** 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. Les populations d'oiseaux marins sauvages vivant dans les zones polaires de l'hémisphère sud (notamment les albatros et manchots) sont de plus en plus sujettes à des menaces dues à des maladies infectieuses, en plus d'autres menaces environnementales, et il est important de disposer de données de base sur les dynamiques éco-épidémiologique de ces systèmes afin de comprendre les processus en jeu et pour les plans de conservation des espèces menacées. Les populations de vertébrés se reproduisant en colonies sont particulièrement importantes à étudier dans ce contexte car de par leur regroupement en unités de forte densité pendant la reproduction, elles peuvent subir des épisodes de mortalités pouvant atteindre des centaines voire des milliers d'individus. Le projet repose sur la réalisation de suivis éco-épidémiologiques par la collecte d'échantillons sanguins et d'écouillons cloacaux et oropharyngés dans des colonies d'oiseaux marins des îles subantarctiques et par leur suivi individuel par marquage à l'aide de bagues aux pattes ou la pose de loggers GPS miniaturisés. Les agents infectieux concernés sont en particulier la bactérie responsable du choléra aviaire *Pasteurella multocida*, les virus de l'Influenza Aviaire, le virus de la maladie de Newcastle, la bactérie responsable de la maladie de Lyme *Borrelia burgdorferi* sensu lato, des flavivirus et le parasite *Toxoplasma gondii*. Les approches moléculaires permettent aussi d'explorer la dynamique des communautés d'agents infectieux et la distribution et l'évolution des antibiorésistances dans ces milieux fortement isolés. Les espèces et effectifs concernées pour la durée du projet sont: Labbe subantarctique (*Stercorarius antarcticus*, n = 300), Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus*, n = 300), Gorfou sauteur du sud (*Eudyptes chrysocome*, n = 300), Gorfou macaroni (*Eudyptes chrysolophus*, n = 300), Manchot papou (*Pygoscelis papua*, n = 150), Albatros hurleur (*Diomedea*

exulans, n = 150), Pétrel à menton blanc (*Procellaria aequinoctialis*, n = 150), Pétrel géant (*Macronectes giganteus*, n = 150), Pétrel de Hall (*Macronectes halli*, n = 90), Cormoran impérial (*Leucocarbo verrucosus/melanogenis*, n = 300), Chionis bec en fourreau (*Chionis minor*, n = 150), Albatros fuligineux à dos sombre (*Phoebastria fusca*, n = 90), Albatros à sourcil noir (*Thalassarche melanophris*, n = 150), Pétrel bleu (*Halobaena caerulea*, n = 60), Prion de Belcher (*Pachyptila belcheri*, n = 60), Pétrel plongeur commun (*Pelecanoides urinatrix* ; n = 60), Albatros à bec jaune (*Thalassarche carteri*, n = 300), Gorfou sauteur du sud (*Eudiptes moseleyi*, n = 300), Albatros d'Amsterdam (*Diomedea amsterdamensis*, n = 90), Manchot Adélie (*Pygoscelis adeliae*, n = 150), Labbe de McCormick (*Stercorarius maccormicki*, n = 150). Le nombre total d'individus est de 3750. Etant donné le sujet de l'étude, les espèces des populations sauvages concernées ne peuvent être remplacées. Le projet fait suite de premières campagnes d'échantillonnages ayant permis l'obtention de résultats importants. Les prélèvements sont complétés par des autopsies réalisées lorsque des événements de mortalités sont détectés. Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction et de raffinement pour permettre des comparaisons pertinentes des taux d'exposition aux agents infectieux entre groupes d'individus échantillonnés, ainsi que des déplacements de certaines catégories d'individus. 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.

**19998** La transplantation d'organe solide constitue le traitement curatif de choix des patients présentant des défaillances d'organes à un stade terminal.

Des phénomènes liés à l'ischémie et aussi à la reperfusion, séquences inhérentes à la transplantation d'organes solides, sont à l'origine de processus physiopathologiques qui vont contribuer aux lésions du greffon. Ce sont ces lésions qui sont responsables de dysfonctionnements précoces et tardifs réduisant la durée de vie du greffon.

L'ischémie correspond à la phase pour laquelle l'organe du donneur est isolé de la circulation sanguine et subit un défaut d'apport en nutriments et en oxygène, ceci depuis le prélèvement chez le donneur jusqu'à la remise en circulation de l'organe chez le receveur. La reperfusion de l'organe chez le receveur se traduit par une reprise de la circulation sanguine permettant le retour de l'apport en nutriments et en oxygène. Dans le cas de la greffe de foie, la séquence d'ischémie-reperfusion (I/R) peut entraîner des lésions sévères du foie transplanté, à l'origine de dysfonctions du greffon et potentiellement de rejet de l'organe à court ou long terme.

En conséquence, après les progrès engendrés par les traitements immunosuppresseurs nécessaires pour contrecarrer le rejet de greffe, une priorité majeure est désormais d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents aux dysfonctionnements associés à l'I/R et in fine de mettre en place des stratégies thérapeutiques visant à les limiter.

Des travaux récents en modélisation animale suggèrent la mise en jeu du système immunitaire dans les lésions tissulaires hépatiques observées au décours immédiat de la séquence d'I/R. Les cellules T innées, dont leur archétype iNKT (pour « invariant natural killer T cells »), sont connues pour avoir un rôle majeur dans le recrutement et l'activation cellulaire à la base de la réaction inflammatoire délétère provoquée par l'I/R.

Le métabolisme des cellules endothéliales est également impacté après I/R. Elles libèrent du lactate via son transporteur MCT-1 (Monocarboxylate transporter 1) qui intervient dans la réponse inflammatoire et notamment avec nos molécules et cellules d'intérêt.

Notre objectif général est :

1/ De caractériser les éléments cellulaires de l'immunité ainsi que les molécules solubles impliquées dans l'inflammation, dénommées interleukines et leurs récepteurs, qui sont responsables des effets délétères accompagnant la séquence d'I/R hépatique. Pour cela, nous utiliserons une I/R dite « chaude », c'est-à-dire en interrompant chirurgicalement le flux sanguin hépatique puis en le rétablissant chez le même animal. Nous observerons aussi les mécanismes de réparation mis en

place par l'organisme sur des durées variables. L'implication des cellules T innées, des interleukines et de leurs récepteurs ainsi que de transporteurs spécifiques, notamment ceux du lactate, sera recherchée *in vivo* en utilisant des souris respectivement rendues déficientes pour ces éléments cellulaires et moléculaires par transgénèse ou en neutralisant ces voies d'activation par injection d'anticorps ou de molécules antagonistes.

2/ D'identifier la source des populations cellulaires impliquées. Pour cela, nous serons amenés à retirer chirurgicalement la rate où sont stockés les cellules immunitaires afin d'évaluer l'origine locale versus à distance (rate) du recrutement cellulaire lors du phénomène d'I/R.

3/ Identifier la cinétique d'activation des cellules immunitaires impliquées dans l'organe cible ainsi que les mécanismes d'action de ces cellules et notamment des iNKT. Pour cela, nous transférerons nos cellules d'intérêts provenant de souris donneuses à des souris receveuses déficientes pour ces cellules et/ou dont les organes sources auront été neutralisés.

La règle des 3R a été prise en compte dans ce projet.

Les méthodes d'études *in vitro* sont très limitées pour étudier l'I/R hépatique car trois éléments très importants sont absents dans les modèles de culture cellulaire :

1/ la complexité des populations cellulaires du foie, 2/ son architecture, qui organise les relations entre ces populations cellulaires, 3/ sa vascularisation, qui permet la circulation des cellules immunitaires et des molécules vers des zones et donc des populations cellulaires spécifiques. Il est donc nécessaire d'évaluer de manière intégrative la mise en jeu des éléments immunitaires et métaboliques dans les lésions d'I/R en utilisant un modèle animal. Le choix de la souris repose sur l'utilisation de souris transgéniques irremplaçables et à notre expertise acquise dans la lecture des réponses immunes chez la souris.

Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux minimum requis pour les analyses statistiques pour chaque procédure découle d'un compromis entre d'une part les questions de minimisation et d'autre part l'accès à l'information scientifique, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire en modélisation des réponses immunes chez la souris. Nous proposons donc un échantillon de 12 animaux par groupe permettant d'obtenir des résultats exploitables sur le plan statistique. Le test bilatéral Mann-Whitney sera utilisé pour la comparaison de deux groupes, et le test unilatéral Anova suivi du post-test Tukey seront utilisés pour la comparaison de trois groupes ou plus. La réalisation de ce projet de 5 ans nécessitera, par conséquent, un total de 1471 animaux dont 25 animaux seront utilisés pour la formation sous tutorat des personnes aux gestes chirurgicaux pour réduire des pertes prévisibles liées à la chirurgie d'environ 10%.

Enfin, dans un souci de raffinement, une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux tout au long de la vie de ceux-ci. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien de leur état de santé (grilles de suivi individuel), les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées (enrichissement du milieu, hébergement en groupe) et des procédures seront mises en place en cas de problème observé (soins ou mis à mort si un point limite est atteint). Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie et les animaux bénéficieront d'une analgésie afin de réduire au minimum la douleur liée à la chirurgie.

#### **19999** 1- Intitulé du projet

Imagerie d'une stratégie de thérapie cellulaire après injection intra articulaire dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase

#### 2- Durée du projet (en mois)

60 mois

#### 3- Mots-clés (maximum 5)

Osteoarthrose, médecine régénérative, cellules souches mésenchymateuses, imagerie *in vivo*

#### 4- Finalité du projet

Recherche translationnelle et appliquée

## 5- Objectifs et bénéfices escomptés du projet

Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches de thérapies cellulaires pour réparer ou régénérer le cartilage détruit suite aux pathologies ostéo-articulaires. Les cellules souches mésenchymateuses possèdent des propriétés anti-inflammatoires et chondroprotectrices qui les rendent particulièrement intéressantes pour mettre en place un traitement de ces maladies.

L'objectif de ce projet collaboratif est de développer une technique d'imagerie aux rayons X afin d'effectuer le suivi in-vivo de ces cellules souches mésenchymateuses marquées à l'or, associées ou non à un hydrogel marqué à l'iode, après implantation intra-articulaire dans un modèle murin d'arthrose induite à la collagénase.

Ce projet repose sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses d'origine humaine ; il est démontré que les cellules humaines ne sont pas rejetées et possèdent un effet thérapeutique chez la souris. Le développement de la pathologie sera contrôlé en cours d'expérimentation par imagerie par résonance magnétique (IRM). Le suivi longitudinal du devenir des cellules sera réalisé par imagerie X dans les 6 semaines après induction du modèle d'arthrose.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Un total de 186 souris sera utilisé au maximum. Le modèle d'arthrose chez la souris présente l'avantage de reproduire assez fidèlement les caractéristiques cliniques des formes inflammatoires d'arthrose observées chez l'Homme et est considérée comme référence. De plus, l'utilisation du modèle souris permet de tester l'effet thérapeutique de cellules souches mésenchymateuses humaines qui ne sont pas rejetées par le système immunitaire de la souris.

## 6- Points d'attention supplémentaires

Les animaux seront transportés en vue de leur imagerie in-vivo de 1 à 6 semaines après l'induction du modèle murin d'arthrose à la collagénase. A ce stade, ils ont cicatrisé et ils ne ressentent pas de douleur liée au modèle. Les procédures du projet (imagerie in-vivo réalisée sous anesthésie générale) présentent des contraintes de classe légère pour les animaux et n'engendrent pas de souffrance ou de stress. Par ailleurs l'irradiation de l'animal par les rayons X est maintenue au minimum pour permettre un suivi longitudinal.

## 7- Application de la règle des « trois R »

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 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)
- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Les procédures utilisées pour induire la pathologie ostéoarticulaire étant de degré de sévérité légère au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place.
- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'Homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses humaines et murines dans un modèle pré-clinique pertinent chez l'animal. Des modèles *in vitro* ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules. Plusieurs sous-types d'arthrose existent chez l'Homme, il est donc nécessaire de mettre en place des modèles *in vivo* reproduisant le plus fidèlement possible les atteintes humaines. Par ailleurs, des tests ex vivo ont été réalisés au préalable afin d'obtenir la preuve de concept de la faisabilité de l'imagerie X dans ce modèle avant de passer à l'imagerie *in vivo*.

**20000** Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle

des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Des résultats préliminaires obtenus dans l'équipe montrent que le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, appelés ILC3 (pour innate lymphoid cells ou cellules lymphoïdes innées de type 3).

Les ILC3 partageant l'expression de nombreuses molécules avec certains lymphocytes, il est primordial de pouvoir discriminer ces deux types cellulaires. C'est pourquoi, nous utiliserons des modèles de souris immunodéficientes. Nous utiliserons des souris ne possédant pas de lymphocytes et des souris ne possédant ni lymphocytes ni ILC3. Nous pourrions alors vraiment discriminer l'impact de ces deux types de cellules sur l'efficacité anti-tumorale du cisplatine lors d'expériences de croissance tumorales. Les résultats seront mis en perspective avec ceux obtenus dans des souris sauvages, possédant des ILC3 et des lymphocytes. Nous utiliserons un modèle de tumeur : TC-1 (lignée de cancer du poumon) qui possède un fort infiltrat en globules blancs après traitement par cisplatine. De plus, nous injecterons certaines souris sans lymphocytes ni ILC3 avec des lymphocytes afin d'obtenir un modèle dépourvu uniquement d'ILC3. La croissance tumorale sera alors suivie 3 fois par semaine et les souris seront mises à mort à la fin de la croissance tumorale, lorsque les tumeurs auront atteint un grand axe de 20mm.

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 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 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, traitements et sacrifice) seront réalisées sous anesthésie, les souris bénéficieront de cages avec de l'enrichissement 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. Des points limites adaptés ainsi que des critères d'arrêt à ces expériences ont été définis. Les souris seront maintenues dans des cages ayant un milieu enrichi. Cette étude nécessitera 240 souris Rag-/-gamma c-/-, 80 souris Rag-/- et 80 souris WT C57Bl6. Cette étude durera 3 ans et utilisera 400 souris au total.

**20001** Ce projet fait l'objet d'une réévaluation ayant été approuvé en 2016. Cependant, dans cette demande, une technique récente a été ajoutée dans la procédure 6 (technique de tGFR).

Le diabète est une maladie chronique caractérisée par un taux de glucose élevé dans le sang, l'hyperglycémie. Des hyperglycémies répétées et prolongées entraînent à long terme une altération des nerfs et des vaisseaux sanguins présents dans tout le corps. Ce sont les complications du diabète qui peuvent se traduire par une cécité, des atteintes des pieds pouvant conduire à des amputations, des infarctus et des accidents vasculaires cérébraux, des dysfonctions urinaires ou une insuffisance rénale.

Dans le cadre de notre activité, nous nous intéresserons aux dysfonctions urinaires et à l'insuffisance rénale provoquées par le diabète. Plus de 80% des patients souffrant de diabète présentent des dysfonctions urinaires et plus de 40% des patients diabétiques développent au cours de leur vie une néphropathie diabétique (pathologie multifactorielle).

L'objectif de ce projet sera d'évaluer, dans un modèle de diabète chez le rat, l'effet de candidats médicaments sur les dysfonctions urinaires et sur le développement de la néphropathie diabétique afin de prévenir et/ou traiter les complications rénales et vésicale de cette pathologie. Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant d'étudier la pathologie du diabète dans son ensemble (évaluation de la fonction vésicale et/ou rénale) sont inexistantes ; c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire.

Il existe différents modèles animaux permettant d'étudier cette pathologie : nous avons choisi l'induction du diabète par injection intraveineuse de streptozotocine, un agent alkylant causant une insuffisance pancréatique chimio-induite (mort des cellules bêta et de toutes les cellules porteuses

du transporteur du glucose GLUT2 (cellules du rein, et du foie)). Pour accélérer le développement et l'installation de la néphropathie diabétique et ainsi réduire la durée de l'expérimentation, certains animaux pourront être soumis à une néphrectomie unilatérale une semaine avant l'administration de streptozotocine. Toutefois, l'utilisation d'animaux déjà diabétiques n'est pas à exclure.

Notre stratégie permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

Raffinement : 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 sera introduit dans l'hébergement des animaux. De plus, les animaux seront observés quotidiennement par du personnel qualifié. De plus, lors des procédures sous anesthésie, les animaux seront placés sur des plaques chauffantes thermo régulées afin de maintenir leur température corporelle. Nous avons établi des points d'intervention afin de limiter la douleur à son minimum :

- Addition de tunnels en cas de bagarres entre animaux
- Mesure du poids des animaux

Les animaux seront surveillés pendant toute la durée de l'expérimentation afin de détecter l'apparition d'éventuels comportements atypiques tels que perte de poids importante, difficulté à se mouvoir, se nourrir, boire qui pourront nécessiter l'euthanasie des animaux selon la gravité des points limites.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1440 rats avec 12 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 8 animaux inclus), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. De plus, l'induction du diabète provoque une mortalité estimée à 10%. Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant dans la mesure du possible, d'une part de mesurer la valeur basale de chaque animal (l'animal est son propre contrôle dans le cas de non prétraitement) et d'autre part, d'évaluer avec des cages à métabolisme la fonction rénale et/ou vésicale en récoltant l'urine à différents temps de façon non invasive pendant toute la durée de l'expérimentation. Dans le cas de prétraitements, un nombre minimum d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R. Ceci tendant donc à réduire le nombre d'animaux utilisés.

Remplacement : Il n'est pas possible de remplacer totalement le recours à l'expérimentation animale, aucune méthode alternative pouvant à ce jour, mimer la pathologie.

De plus ce projet devra subir une évaluation rétrospective étant donné qu'au moins une des procédures est classée sévère.

**20002** Depuis plus d'une dizaine d'année, l'étude du microenvironnement tumoral a pris une place importante dans le domaine de la recherche sur le cancer. Le microenvironnement tumoral est l'environnement tissulaire et cellulaire au sein duquel se développent les tumeurs. Il se compose de cellules saines et de cellules cancéreuses, d'une matrice extracellulaire dans laquelle baignent les cellules servant de support et soutien. De plus, le microenvironnement est constitué de cellules immunitaires dont le rôle est de défendre l'organisme contre les infections. Enfin, il inclut les vaisseaux sanguins apportant les nutriments et l'oxygène, et les vaisseaux lymphatiques assurant l'élimination des déchets de l'organisme. La communication de ces différents composants avec les cellules cancéreuses favorise la croissance des tumeurs ainsi que leur échappement à la surveillance immunitaire. L'étude du microenvironnement tumoral a ouvert une nouvelle voie de recherche, conduisant à l'émergence de nouveaux traitements visant les composants du microenvironnement et non les cellules cancéreuses elles-mêmes. Ces traitements empêchent notamment la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux mais aussi stimulent les cellules immunitaires luttant contre les cellules cancéreuses.

L'objectif de ce projet est de déterminer si un autre composant du microenvironnement tumoral, la plaquette, cellule de la composition du sang, constitue ou non une cible pour améliorer les traitements anti-cancéreux. Différentes études suggèrent en effet que la plaquette, initialement



connue pour son rôle clé dans l'arrêt des saignements, favoriserait la croissance et la dissémination des cancers.

Pour cette étude, nous utiliserons différents modèles de tumeurs (repérables par une masse) qui sont le mélanome et le cancer du sein chez la souris dont le développement est de 14 jours et 21 jours réciproquement. Ces modèles consistent en l'injection sous-cutanée de cellules tumorales, réalisée sous anesthésie gazeuse. L'impact des plaquettes sur le développement de ces tumeurs sera déterminé par comparaison de l'évolution des tumeurs entre des souris contrôles et des souris transgéniques ayant un défaut quantitatif de plaquettes ou un défaut qualitatif de plaquettes n'affectant pas le bien-être des animaux. Les souris porteuses de tumeurs seront suivies tout au long du développement tumoral (état général, aspect de la tumeur) jusqu'à leur euthanasie et au prélèvement des tumeurs sur lesquelles seront conduites différentes analyses biologiques et histologiques. Par ailleurs, les souris seront suivies par la réalisation de différents prélèvements sanguins (avant injection des cellules tumorales, pendant le développement tumoral et le jour de la mise à mort des animaux) pratiqués sous anesthésie gazeuse. 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.

Ce projet nécessite 632 souris mâles et femelles pour l'ensemble des procédures expérimentales sur une période de 5 ans, divisées en 6 groupes : 270 souris contrôles pour le groupe contrôle et 362 souris transgéniques réparties dans 5 groupes de souris différents en fonction de leur type de défaut plaquettaire. Ce nombre de souris a été élaboré en respectant la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) et en prenant en compte les différents groupes (modèle de tumeur, type de défaut plaquettaire) 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 indispensable par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de la contribution des plaquettes au développement du microenvironnement tumoral. 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. De plus, des mesures de raffinement seront prises en compte par l'administration d'anti-douleurs ainsi que par de l'enrichissement dans les cages. La souffrance animale 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.

**20003** Nous avons démontré dans le passé que la protéine ENSA est essentielle « *in vitro* » pour la division des cellules en culture. Nous avons ensuite lancé un projet « *in vivo* » visant à identifier le rôle de la protéine ENSA dans le contrôle du développement embryonnaire et dans la division cellulaire normale et tumorale des tissus. Fait intéressant, les données issues de ce projet indiquent que, contrairement à ce qui était attendu par rapport à nos résultats « *in vitro* », l'élimination de cette protéine n'a pas d'impact sur la prolifération cellulaire telle qu'elle a été observée lors de l'embryogenèse, mais a induit un ralentissement de la prise de poids corporel des souris associée à une perte complète de tissu adipeux blanc et une diminution significative du tissu adipeux brun. L'objectif de cette nouvelle saisine est d'élucider les causes de ce phénotype. Pour cela, nous analyserons chez un modèle de souris génétiquement modifiées pour la protéine ENSA les différents paramètres qui pourraient expliquer la réduction de la prise de poids tels que : la dépense énergétique, le métabolisme du glucose, la température corporelle, l'endurance à l'exercice, l'exercice volontaire, la réponse beta-adrénergique et la résistance au froid.

Il s'agit de procédures non invasives (exercice volontaire et mesure de composition corporelle par IRM) ou peu invasives (injections intra-péritonéales, prélèvements sanguins à la queue, implantation intra-péritonéale d'une sonde télémétrique de température et course sur tapis roulant). Le nombre prévu de souris à utiliser dans le projet sera de 180 réparties en 3 procédures et pour chaque procédure, 4 lots de 15 animaux.

« Remplacer » les modèles animaux :

L'analyse intégrée « *in vivo* » en mammifère, et notamment chez la souris, est le modèle le plus proche d'un point de vue mécanique de ce qui se passe chez l'homme. Ainsi donc, les approches expérimentales que nous souhaitons mettre en œuvre chez la souris permettront de déterminer son rôle exact « *in vivo* ». Il n'existe pas autre modèle permettant l'étude du rôle de cette protéine « *in vivo* ».

« 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. Dans le but de réduire ce nombre, après une période de récupération variable de 4 à 15 jours, les mêmes animaux seront soumis à différents tests expérimentaux dans chaque procédure.

« Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites :

Les souris seront hébergées à raison de 5 par cage afin de limiter stress et angoisse. Pour réduire la douleur et soulager l'inconfort des animaux, ils seront observés quotidiennement et les signes de souffrance (perte excessive de poids, hyperactivité ou au contraire isolement, hérissément des poils, dos voûté) seront recherchés. Si les souris manifestent des signes de stress, de la nourriture gélifiée sera placée dans la cage pour faciliter la réhydratation et limiter la souffrance des animaux. Leur environnement sera enrichi par l'ajout de nids de ouate et de tunnels rouges en plexi. Les tunnels servent de cachette, mais aussi de moyen de transfert des animaux lors du change et lors des expérimentations ce qui limite leur stress. Enfin, les animaliers s'occuperont toujours des mêmes souris qui seront changées selon un planning hebdomadaire strict.

**20004** En début de lactation, l'ingestion est un facteur limitant pour la production laitière induisant une balance énergétique souvent négative avec des conséquences sur la santé, la reproduction et le niveau de production des vaches laitières. En élevage, toutes les vaches reçoivent généralement une ration unique pendant leur lactation alors que leur capacité d'ingestion dépend de plusieurs facteurs et notamment des caractéristiques de l'animal (âge, poids, date de vêlage), du stade de lactation et de la composition de la ration distribuée. Plusieurs stratégies alimentaires ont été évaluées afin de réduire la balance énergétique en début de lactation et de permettre à la vache d'exprimer son potentiel laitier. L'ajustement du ratio fourrage concentré à l'auge, c'est-à-dire la distribution d'une ration enrichie en concentrés (plus d'énergie) en début de lactation suivie d'une ration contenant moins de concentrés une fois la période de mobilisation terminée, semble être une stratégie prometteuse pour augmenter la production laitière. Cependant des études précédentes ont rapporté que les effets d'une stratégie fondée sur un ajustement du ratio fourrage concentré dépendent également de la variable utilisée pour l'ajustement du ratio. Avec un ajustement basé sur la réponse de la production laitière, la production laitière est souvent équivalente ou un peu plus élevée comparé à une ration unique. Avec un ajustement basé sur le bilan énergétique calculé en début de lactation, la production de lait et les composants du lait augmentent sans modifier l'apport en matière sèche par rapport à une stratégie de ratio fourrage concentré fixe pendant la lactation. Cette deuxième approche semble donc plus prometteuse, et le poids peut représenter un bon indicateur de la balance énergétique, facilement mesurable. De plus, l'individuation de cette stratégie à l'échelle de la semaine permettrait de gagner en précision et d'apporter à chaque vache la bonne proportion de concentrés dont elle a besoin. L'objectif de ce projet est donc de démontrer la faisabilité et l'intérêt d'une alimentation sur mesure, ajustée individuellement et chaque semaine, pour des vaches laitières. Un total de 40 vaches laitières seront intégrées à l'expérimentation dès le premier jour de leur deuxième lactation. La moitié des vaches recevra une ration standard, dont le ratio fourrages concentrés sera fixe au cours de la lactation (groupe contrôle). L'autre moitié des vaches recevra une alimentation sur mesure dont le ratio fourrages concentrés sera ajusté individuellement et chaque semaine selon le gain ou perte de poids de l'animal au cours de la semaine précédente.

Ces travaux obligent à utiliser des expérimentations *in vivo* car l'ajustement de l'énergie de la ration dépend des caractéristiques de chaque individu (notamment le poids pour cette expérimentation)

qui évoluent aussi en fonction des événements sanitaires et environnementaux que des modèles ne peuvent pas prédire. De plus afin de suivre et comprendre l'effet de la stratégie alimentaire sur le métabolisme énergétique des vaches, 18 prises de sang par vache seront réalisées au cours de l'expérimentation. Le nombre de vaches inclut dans l'essai et le nombre de prises de sang ont été réduits au minimum tout en conservant une puissance de test significative. Les essais seront menés en « binôme » (vache control - vache en alimentation sur mesure), établis selon le poids et la date de vêlage pour montrer l'efficacité des stratégies alimentaires en réduisant le nombre de facteurs de variation. Ces deux derniers points permettront de répondre au principe de "réduction" des 3R. Enfin, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux suivis (ingestion, état de santé général), et toute indication de mal-être des animaux conduira à les sortir de l'expérimentation, en accord avec le vétérinaire, respectant ainsi le principe de "raffinement" des 3R. Enfin, cette étude permettra de collecter des données individuelles de production, de reproduction, et d'activité physique (les vaches seront équipées de colliers d'activité) en lien avec les stratégies alimentaires distribuées et les variables environnementales (mesure de la température et humidité dans l'étable). Ces données alimenteront ensuite nos modèles en cours de développement afin de limiter les expérimentations futures et ainsi de répondre à la demande de « remplacement » (3R) des expérimentations sur les animaux par des simulations via des modèles.

**20005** Dans le cadre de d'un projet de développement d'un composé à visée thérapeutique, nous voulons comparer deux voies d'administration dans le liquide cébrospinal, dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière.

En effet, ces composés thérapeutiques utilisent une approche virale permettant de modifier l'expression de certains gènes au niveau du cerveau. Ces outils permettent de corriger des défauts génétiques au sein des cellules, mais leur efficacité est variable selon le tissu qu'ils atteignent lors de leur injection. C'est pourquoi nous devons valider cette diffusion dans une étude préalable.

Nous avons ciblé deux possibilités d'injection : l'injection intra-ventriculaire (ICV), dans l'espace situé entre les lobes du cerveau, ou l'injection dans la cisterna magna (ICM), à la base de la nuque. Ces deux méthodes peuvent entraîner des diffusions différentes dans le cerveau, et nous souhaitons les comparer pour définir la meilleure approche dans le protocole expérimental qui suivra, utilisant les composés à visée thérapeutique.

Ces études auront lieu sur le modèle Souris qui constitue la meilleure approche *in vivo* préclinique dans le développement de ces candidats médicaments ; faisant suite aux développements *in vitro* indispensables.

Pour effectuer cette comparaison, nous prévoyons trois protocoles.

Le premier consistera dans l'injection de colorant, afin de confirmer les coordonnées d'injection. En effet, ce paramètre peut varier selon l'âge et la souche d'animaux utilisés.

Ensuite, le second protocole consistera dans l'injection de vecteurs viraux exprimant un marqueur fluorescent. Cela permettra de déterminer le lieu réel d'expression des vecteurs viraux plusieurs jours après l'injection, afin de reproduire de la meilleure manière, la dynamique des candidats médicaments.

Si les résultats sont concluants, un dernier protocole sera effectué avec le vecteur candidat médicament dans les mêmes conditions, afin de mesurer l'expression des modifications génétiques apportées par le vecteur.

Au total, ce protocole utilisera un total de 50. Tous les efforts seront entrepris pour réduire ce nombre.

**REMPACEMENT** : le modèle animal constitue l'un des outils à notre disposition dans le développement de candidats médicaments. Toutes les étapes de développement *in vitro* ont été effectuées et nous devons maintenant tester l'efficacité thérapeutique dans un organisme complet, proche de l'Homme. Nous ne disposons actuellement pas d'alternative pour cela.

**REDUCTION:** Les effectifs dans les groupes expérimentaux sont réduits mais suffisants pour les analyses histologique ou génétiques planifiées. Il n'est pas possible de les réduire sans impacter la robustesse de l'analyse finale.

Si durant le développement de ce projet nous constatons que l'une des voies ne peut pas être retenue, nous effectuerons uniquement l'autre voie pour obtenir des éléments essentiels à la confirmation de la réalisation du projet suivant à but thérapeutique sur des animaux modèles génétiquement modifiés.

**RAFFINEMENT:** Les injections seront effectuées sous anesthésie, les animaux maintenus à température à l'aide d'un matelas chauffant et une surveillance étroite post-injection du site d'injection et de l'état des animaux sera réalisée pour réagir à tout signe de souffrance. Un suivi de poids sera mis en place pour les protocoles étalés sur 2 semaines afin de mettre en évidence une baisse de l'état général des animaux le cas échéant. En cas d'une baisse de 20% du poids initial sur une semaine, les animaux seraient euthanasiés immédiatement pour éviter toute souffrance.

**20006** Ce projet fait l'objet d'une réévaluation ayant été approuvée en 2016.

Chez la femme, une des pathologies gynécologiques impliquant le muscle utérin est l'accouchement prématuré (avant la 37<sup>e</sup> semaine d'aménorrhée, soit 8 mois de grossesse).

D'après l'OMS, chaque année, quelque 15 millions de bébés naissent prématurément, ce qui représente plus d'une naissance sur 10. Plus d'un million d'enfants décèdent chaque année en raison de complications liées à la prématurité (plus la naissance est précoce, plus les risques de séquelles sur les plans respiratoire et neurologique augmentent). A l'échelle mondiale, la prématurité est la première cause de mortalité chez les enfants de moins de 5 ans. Dans presque tous les pays disposant de données fiables, les taux de naissances prématurées sont en hausse.

Sur 184 pays, le taux des naissances prématurées varie entre 5% et 18 % des bébés nés.

Il est toutefois possible d'agir pour empêcher que les bébés naissent prématurément soit par un simple repos à domicile, soit par une hospitalisation avec des médicaments bloquant les contractions, ceci en fonction de la santé de la mère et de la date du terme.

L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle d'accouchement prématuré chez la souris gestante afin de tester l'efficacité de candidats médicaments à retarder ou arrêter un accouchement prématuré.

Notre stratégie permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et ainsi de réaliser ce projet selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

**Remplacement :** Actuellement, les méthodes alternatives ex vivo permettant d'étudier l'accouchement prématuré dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter cette pathologie. Il n'est pas possible de remplacer totalement le recours à l'expérimentation animale, aucune méthode alternative pouvant à ce jour, mimer la pathologie.

**Raffinement :** 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 suivi quotidien de leur état sera réalisé par du personnel qualifié. Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant de réaliser les expérimentations sous caméra afin de suivre un même animal sur quelques jours. Toutefois l'animal ne pouvant pas être dans ce projet son propre contrôle, nous apporterons une attention particulière à son bien-être, avec l'ajout de nourriture dans la cage d'expérimentation ainsi, que des enrichissements type carré de coton pour la nidation.

Nous avons établi des critères qui mettront fin à l'expérimentation si nécessaire :

- Altérations des fonctions normales (impossibilité d'uriner, de s'alimenter, de se mouvoir...)
- Comportements atypiques (vocalisation, prostration...)
- une perte de poids >20% du poids initial

Dans le cas où l'animal présenterait des difficultés pour s'alimenter ou s'abreuver, l'accès à l'aliment et la boisson lui serait facilité en plaçant ces derniers directement dans la cage.

De plus, si un animal présentait des blessures, il serait euthanasié si besoin.

Une attention particulière sera donnée aux animaux recevant du LPS, puisque celui-ci mimant une infection bactérienne, il y a une mortalité in-utero des fœtus importants, entraînant une non délivrance et un affaiblissement de la mère. Nous avons mis en place des critères précoces (arrêt des mouvements in-utero, visible à la camera en passant les images en accéléré), non déplacement de la mère, tremblement. Dans ce cas-là, la souris est immédiatement euthanasiée.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1 440 souris en raison de 12 souris par groupe, le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés afin de respecter la règle des 3R.

**20007** Les industries pharmaceutiques et biotechnologiques ainsi que les autorités réglementaires manifestent un intérêt croissant pour les modèles *in vivo* humanisés. Ces derniers miment de manière plus spécifique la physiologie humaine permettant d'étudier des composés de recherche en extrapolant les effets qu'ils auront sur leur utilisateur final avec davantage de sécurité.

Dans cette optique, un modèle murin possédant à la fois un système immunitaire et un foie humanisés permet non seulement de tester l'efficacité de composés à visées thérapeutiques pour des pathologies impactant le système immunitaire (cancer, allergies, asthme...) mais également d'en observer les toxicités métaboliques hépatiques.

Ce projet vise la mise au point d'un modèle de double humanisation et les tests préliminaires nécessaires à sa mise en place. Pour ce faire, des souris immunodéprimées recevront une greffe de cellules souches et une greffe de cellules hépatiques humaines.

Après humanisation, l'administration de composés de recherche sera réalisée par voie entérale (gavage, incorporation dans l'alimentation) ou parentérale (veineuse, intrapéritonéale, sous-cutanée ou intra-musculaire). Une tumeur pourra être également implantée par injection sous-cutanée. Les volumes à administrer seront préétablis par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. A titre d'exemple, pour une souris de 20 g, la limite d'administration sera de 400 µL per os; 200 µL par voie sous-cutanée; 200 µL par voie intrapéritonéale; 50 µL par voie intramusculaire et 200 µL par voie intraveineuse. Ces composés permettront de tester le modèle dans un contexte préclinique, éventuellement en évaluant leurs activités sur une tumeur.

Des prélèvements de sang seront réalisés dans le sinus rétro-orbital, dans la veine saphène ou dans la veine caudale. Les prélèvements au sinus rétro-orbital seront réalisés sous anesthésie générale. La fréquence maximale de prélèvement sera dépendante du poids selon un schéma préétabli par le vétérinaire d'établissement et le comité de bien-être. A titre d'exemple, le volume prélevé sera de 100 µL par semaine, maximum, pour une souris de 20 g. Des tests de laboratoire seront réalisés sur ces prélèvements (eg : cytométrie en flux ou ELISA) et permettront d'objectiver la réussite de l'humanisation et les effets des molécules.

L'état de santé des animaux sera évalué tous les jours par une échelle de scoring adaptée aux études sur le système immunitaire et le foie. Il s'agit d'une échelle de scores cumulatifs prenant en compte l'état du poil, les mouvements, l'activité, le score corporel et la pâleur des souris. En parallèle, une prise de poids et du volume de la tumeur sera réalisée 2 fois par semaine. La fréquence pourra être au stade de l'étude. Une perte de plus de 25% de leur poids le plus élevé sera considérée comme une raison de mise à mort. Une tumeur ayant atteint un volume supérieur à 1500mm<sup>3</sup> sera également considérée comme une raison de mise à mort. Toute anomalie dans l'état de santé des animaux non objectivable par l'échelle de scoring devra immédiatement être rapportée au vétérinaire d'établissement qui aura pleine autorité pour envisager un traitement ou une euthanasie pour raison éthique s'il le juge nécessaire.

REDUCTION:

Un total de 1500 animaux est demandé pour la réalisation de ce projet sur une durée de 5 ans, permettant de réaliser 50 études de 4 groupes (contrôle négatif, contrôlé positif, plusieurs doses ou

traitements à comparer) avec 5 à 10 animaux par groupe afin de mettre en place le modèle et de réaliser des essais précliniques tests. Le nombre d'animaux utilisés dans chaque étude sera réduit au maximum en se basant sur des tests statistiques adaptés aux effets attendus de la série.

#### RAFFINEMENT:

Les souris seront hébergées en cage ventilée par groupe social stable de 2 à 4 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'une hutte en carton seront également disposés. Les souris recevront 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.

#### REMPACEMENT:

Il n'est à l'heure actuelle pas possible de recréer *in vitro* un environnement complexe comme le système immunitaire et d'étudier des composés à visée thérapeutique pour une pathologie impliquant tout en objectivant l'effet de cette molécule sur le foie. La souris constitue donc un modèle scientifiquement valide, robuste et indispensable pour le développement de thérapies innovantes impactant le système immunitaire et le foie.

**20008** La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie inflammatoire chronique qui affecte principalement les articulations où les auto-anticorps pathologiques (auto-anticorps, anticorps reconnaissant des molécules du soi) participent à l'induction et la pérennisation de la maladie. De plus, comme dans de nombreuses maladies auto-immunes, une signature caractéristique d'une activité des interférons de type I (IFN-I ; des molécules du système immunitaire ayant une forte capacité à modifier la réponse immunitaire) est en corrélation avec l'apparition de la maladie et la réponse thérapeutique. C'est spécifiquement le cas dans la PR où la signature IFN-I est associée à la présence d'autoanticorps pathologiques. Cependant, le rôle pathologique de l'IFN dans la PR, les principaux types cellulaires contribuant à cette signature de l'IFN ainsi que son effet de potentialisation de l'effet pathologique des auto-anticorps sont inconnus. Cette étude sera réalisée chez la souris car nous disposons d'un modèle animal adapté. Ce projet concerne une étude pilote pour identifier le rôle potentiel des IFN-I dans l'induction de la pathologie dans un modèle murin d'arthrite induite par des autoanticorps. Pour cela, nous utiliserons des souris dont le récepteur à l'IFN-I n'est pas fonctionnel (IFNARI-KO) et nous réaliserons un suivi clinique après administration d'autoanticorps. Nous utiliserons un maximum de 72 animaux répartis en différents groupes expérimentaux. Les résultats obtenus poseront les bases pour réaliser par la suite une étude plus approfondie des mécanismes impliqués dans l'induction de la pathologie par les auto-anticorps et qui sont dépendants des IFN-I.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Remplacement : l'étude du rôle des IFN-I dans l'induction d'une réponse immunitaire pathologique ne peut se faire que sur des animaux vivants. Il n'est donc pas possible de prévoir une méthode substitutive pour répondre à la question scientifique de ce projet.

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé pour assurer que les résultats soient statistiquement significatifs tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Il a été calculé en se basant sur l'expérience acquise au laboratoire en termes d'incidence de l'arthrite chez la souris et de mise en évidence d'effet significatif de paramètres mesurés en fin d'expériences.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Des gels de nourriture hydratée seront placés dans la litière afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement. Par ailleurs, nous maîtrisons les gestes expérimentaux et nous surveillerons le site d'injection.

**20009** Le cerveau est constitué de neurones et d'un autre type de cellules, les cellules gliales, auxquelles appartiennent les astrocytes. Alors que le rôle des neurones dans le fonctionnement cérébral est largement reconnu et étudié, le rôle des astrocytes et leurs interactions avec les neurones reste très largement méconnu. Les astrocytes ont longtemps été essentiellement considérés comme support métabolique des neurones mais de plus en plus d'études montrent que ces cellules sont également impliquées dans la régulation de l'activité neuronale. Le but de ce projet est précisément d'étudier l'influence de l'ocytocine sur les relations neurones-astrocytes lors d'interactions sociales, un processus cognitif complexe impliquant les circuits neuronaux du décodage de l'environnement et des émotions ainsi que de la prise de décision. L'ocytocine est un neuropeptide connu pour jouer un rôle crucial dans la naissance et l'allaitement mais également dans les comportements sociaux. L'ocytocine est sécrétée par les neurones de l'hypothalamus et les astrocytes y répondent grâce à l'expression de récepteurs à l'ocytocine à leur surface. Dans le cadre de ce projet, nous nous concentrons sur l'influence de la voie ocytocinergique neurone-astrocyte dans le comportement social en supprimant l'expression du récepteur à l'ocytocine dans tous les astrocytes du cerveau dans des souris males et femelles. Cette approche globale ciblant tous les astrocytes devrait impacter l'activité neuronale et modifier les fonctions sociales, émotionnelles et cognitives.

Pour mesurer l'impact de l'ocytocine sur les astrocytes lors des interactions sociales, nous mettrons en place différentes méthodes sur un modèle murin. Ce projet nécessite des expériences chez l'animal entier car nous nous intéressons à l'activité des cellules lors de comportements sociaux entre individus vivants. Ces expériences mobilisent différentes aires cérébrales et requièrent l'intégrité des réseaux neuronaux et gliaux qui ne peuvent être remplacés par des modélisations informatiques ou *in vitro* avec des cellules en culture.

Ce projet de recherche fondamentale se déroulera sur 5 ans et nécessitera 1753 souris. Parmi ces 1753 souris, 373 seront réutilisées ou maintenues en vie pour le maintien des lignées. Nous effectuerons des enregistrements chroniques des activités neuronales et astrocytaires sur l'animal éveillé lors de tâches comportementales.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Nous réduirons au maximum la douleur et le stress générés par l'expérimentation en utilisant de façon adaptée des produits anesthésiques et analgésiques. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles avec des milieux enrichis lors d'isolement. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience, en particulier après les procédures chirurgicales, afin de détecter tout indicateur de souffrance et y pallier. Des points limites au-delà desquels toute expérimentation sur les animaux cessera ont été définis.

Le phénotype des lignées utilisées OXTR fl/fl et Aldh111 CreERT2 sont non-dommageables mais nous ne connaissons pas la dommageabilité de la lignée générée par le croisement de ces deux lignées. Une étude phénotypique sera donc réalisée afin de caractériser la non-dommageabilité de la lignée générée.

## **20010** Contexte du projet

La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie où une partie de l'œil (la rétine) dégénère progressivement. Les patients présentent initialement une cécité nocturne et, plus tard, une perte de la vision centrale qui conduit à la cécité. La RP est un trouble très variable avec des patients développant une perte visuelle symptomatique dans l'enfance alors que d'autres restent asymptomatiques jusqu'au milieu de l'âge adulte. Il n'y a aucun traitement disponible.

Notre étude se concentre sur la forme de RP causée par des mutations sur le gène nécessaire à la fabrication de la protéine appelée sous-unité cGMP phosphodiesterase 6  $\beta$  (ou PDE6 $\beta$ ). Nous utiliserons pour cela un modèle murin connu pour avoir cette mutation, et qui développe une RP, la souris rd10. Nous injecterons un vecteur de thérapie génique issu d'un virus adéno-associé (AAV)

appelé AAV2/5-hPDE6B. Ce vecteur va fournir aux cellules cibles le gène PDE6B sans mutations, et ainsi compenser la perte de fonction de la PDE6B mutée.

L'objectif du projet est de confirmer la production par le vecteur AAV de la PDE6B fonctionnelle et de tester l'efficacité du lot de vecteur produit sur notre modèle murin. Le laboratoire possède plusieurs outils d'analyses utilisés en ophtalmologie chez l'homme, adaptés à notre modèle animal : - un Micron IV (Phoenix Research Laboratory) qui permet d'enregistrer des électrorétinogrammes (ERG) - un tomographe à cohérence optique (OCT) qui permet de visualiser la rétine en coupe, tout cela sur animal vivant et anesthésié. A la fin du temps d'expérimentation, nous collecterons les rétines pour analyser sa morphologie.

Avantages et dommages escomptés

L'existence de lignées de souris atteintes spontanément de dégénérescence rétinienne en fait un excellent organisme modèle pour notre projet. Travailler *in vivo* permettra de valider notre vecteur, les modèles *in vitro* ne permettant pas d'observer la réponse des cellules dans leur environnement réel. Les techniques qui seront effectuées sont peu invasives et couramment utilisées en recherche ophtalmologique.

Les phénotypes des animaux utilisés sont restreints à la rétine, un organe non-essentiel aux souris et dont la perte totale de fonction n'altère pas la vie des animaux. Le caractère non dommageable des lignées murines utilisées pour ce projet a été établi précédemment.

Nombre et animaux à utiliser.

Nous prévoyons d'utiliser 50 souris au maximum pendant la durée du projet.

Conformité avec les exigences 3R.

i) Réduction: L'ERG et l'OCT permettent de réaliser différents examens sur un même animal, et de suivre l'efficacité de la thérapie au cours du temps.

ii) Remplacement: Les AAV utilisés permettent de produire la PDE6B sur cellules en culture. Pour poursuivre l'étude avec des tests fonctionnels, il n'existe pas de modèles cellulaires disponibles. Notre étude doit donc être validée sur un modèle murin.

iii) Raffinement: Les animaux sont élevés dans un environnement contrôlé et enrichi. Les procédures d'anesthésies seront appropriées aux expérimentations. La dose efficace et non toxique d'AAV à utiliser a déjà été validée au cours de travaux précédents. Les points limites sont déterminés en fonction de la santé générale des animaux.

**20011** Dans le cadre de nos projets de recherche sur le vieillissement, nous souhaitons étudier les éléments qui entraînent la ségrégation entre les individus qui vont "bien" vieillir et les individus susceptibles de devenir fragiles puis dépendants. La perte de la fonction musculaire au cours du vieillissement est une donnée fondamentale dans ce contexte.

Chez l'humain, l'angle de pennation (= angle que forment les fibres musculaires par rapport à l'axe selon lequel le muscle exerce une force de contraction) est mesuré en échographie et constitue une variable d'intérêt pour évaluer la fonction musculaire.

Notre équipe a accès, via une plateforme de la région, à un échographe de pointe qui pourrait nous permettre de mesurer cet angle de pennation chez la souris. Nous souhaitons démontrer que cette mesure peut devenir une variable d'intérêt, obtenue de manière non invasive, pour évaluer la fonction musculaire chez la souris et son évolution au cours du temps.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 144 souris, tests et standardisation de la mesure compris.

Les animaux seront pris en charge par du personnel de la zootechnie compétent et habilité qui vérifiera leur état et placera de l'enrichissement dans les cages pour permettre aux animaux de faire un nid et éviter les bagarres. Les cages seront passées en revue quotidiennement pour repérer les blessures éventuelles, des comportements anormaux (isolement, pas de réflexe de fuite lorsque l'on vient attraper l'animal), ou d'éventuels problèmes de dentition empêchant une prise alimentaire correcte. Les animaux seront pesés 1 fois par semaine pour suivre le poids corporel, indice clef du bien-être animal. Le nombre d'animaux par lot est limité au minimum permettant de réaliser des



tests statistiques fiables. Si l'angle de pennation peut être mesuré tel que nous le proposons et utilisé comme variable d'intérêt chez la souris, cela entraînera une diminution du nombre d'animaux utilisés dans les études de la fonction musculaire car l'échographie, qui est une procédure non invasive, peut être réalisée plusieurs fois chez une même souris au cours d'un protocole.

Ce projet respecte au maximum la règle des 3R.

**Remplacer :** Le vieillissement est un phénomène physiologique qui met en jeu l'ensemble de l'organisme. Il est malheureusement impossible de se passer intégralement d'animaux pour réaliser des études sur la physiologie du vieillissement musculaire. Cependant notre projet vise à remplacer des mesures obtenues sur le muscle hors de l'organisme, donc après euthanasie de l'animal, par une mesure réalisable sur souris vivante, ne provoquant aucune douleur (échographie).

**Réduire :** A l'heure actuelle, le vieillissement du muscle est estimé par des tests fonctionnels sur l'animal vigile puis par des mesures et observations du muscle suite au prélèvement de celui-ci (et donc euthanasie de l'animal). Nous pensons que l'échographie permettrait d'obtenir la mesure d'une variable physiologique objective du muscle, l'angle de pennation, sans prélèvement, donc sans euthanasie de l'animal. Ceci aboutit à la réduction du nombre d'animaux nécessaire.

**Raffiner :** L'échographie est une méthode non invasive et non douloureuse (anesthésie gazeuse de quelques minutes). Ce type d'imagerie respecte le principe de raffinement des expérimentations. Bien entendu, les souris seront échographiées uniquement si elles sont en bon état et en mesure de supporter l'anesthésie. Cette expérimentation sera réalisée par du personnel aguerri et compétent, possédant toutes les habilitations nécessaires et une longue expérience. De l'enrichissement est ajouté dans les cages d'hébergement pour permettre aux souris de faire un nid et le cas échéant (agressivité), des igloos seront placés dans les cages. Le comportement et l'état général des animaux seront observés quotidiennement.

**20012** L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un client qui développe des composés thérapeutiques visant les troubles liés au vieillissement. Les troubles liés au vieillissement (troubles neurodégénératifs, sarcopénie...) ont été largement associés à des déséquilibres des processus d'autophagie et de mitophagie (processus de recyclage des mitochondries endommagées au sein des cellules) dans différents organes. Ces mécanismes représentent ainsi une cible d'intérêt thérapeutique majeur dans la lutte contre les effets du vieillissement. La société cliente souhaite ainsi tester l'impact d'un composé en développement sur les phénomènes de mitophagie au niveau de différents organes dans des contextes d'administration sub-aiguë ou chronique *in vivo*.

Le composé sera administré quotidiennement par voie orale à trois doses différentes pendant 2 jours, 14 jours, 28 jours ou 56 jours et l'impact sur la mitophagie et l'autophagie sera comparé à une administration orale de véhicule pendant les mêmes durées.

La prise alimentaire et le poids corporel des animaux seront mesurés une fois par semaine. A l'issue du traitement, les animaux seront anesthésiés et mis à mort. Différents tissus et organes seront alors prélevés pour mesure du processus d'autophagie : sang, muscles squelettiques (quadriceps, gastrocnémien et soleus), cerveau, coeur, foie, contenu caecal et reins.

Cette étude nécessitera l'utilisation de 128 souris C57Bl/6 divisés en 16 groupes expérimentaux de 8 animaux : (1 composé x 3 doses + 1 groupe contrôle) x 4 temps = 16 groupes.

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole:

- **Raffinement:** Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés par 2 ou 3 en cages ventilées et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout de maisons dôme et de briquettes en bois spécialement conçues pour les rongeurs. L'ensemble des prélèvements terminaux seront réalisés en post-mortem. Par ailleurs, bien que le protocole soit très peu invasif, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis. Ces actions incluent l'emploi d'analgésiques ou le retrait de l'animal du protocole expérimental.

- Réduction: Le nombre d'animaux utilisés par groupe (n=8) a été défini comme le nombre minimum nécessaire pour être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.

- Remplacement: Des études préliminaires *in vitro* et *ex-vitro* ont été réalisées par le client à partir d'une famille de molécules afin de définir le composé ayant les plus fortes chances de succès en termes de développement. L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie à ce stade afin de s'assurer de l'efficacité réelle du composé sur la mitophagie dans différents organes lors d'une administration *in vivo*.

**20013** La Tomographie par Emission de Positons (TEP) est une technique d'imagerie fonctionnelle utilisée couramment par les services de médecine nucléaire. Après l'administration intraveineuse d'une molécule 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 à partir de molécules marquées au fluor-18 (18F), ou 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, aide au développement de candidats médicaments, ...). Pour comprendre le devenir d'un radiopharmaceutique dans un organisme vivant, les essais *in vitro* sont pour l'instant très insuffisants, en raison de la grande complexité des processus physiologiques en jeu, et les évaluations ne peuvent se faire que sur l'animal vivant. La première étape de ces évaluations consiste à étudier le comportement du radiotraceur innovant dans l'organisme, c'est à dire sa pharmacocinétique (cinétiques de distribution, de métabolisation et d'élimination). Ces travaux préliminaires sont réalisés chez le rongeur et permettent de vérifier la faisabilité technique de l'utilisation de la molécule radio-marquée en imagerie TEP avant de débiter des études de plus grande envergure, faisant appel à des modèles animaux de pathologie ou pour des études de pharmacologie plus poussées.

La tyrosine kinase DYRK1A est actuellement reconnue pour être fortement impliquée dans les maladies neurodégénératives. L'inhibition de DYRK1A sur des modèles animaux exprimant des caractéristiques biologiques de la maladie d'Alzheimer a permis de démontrer son implication sur l'hyper-phosphorylation de la protéine Tau et l'apparition des plaques amyloïdes. Le projet a pour but de développer un inhibiteur spécifique de ces kinases à partir du composé prometteur EHT1610, possédant une affinité sub-nanomolaire, et de le radio-marquer au 11C. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de radiotraceur permettant d'imager spécifiquement cette tyrosine kinase, bien que cela puisse être un outil pertinent dans le but de corréliser le taux de DYRK1A au degré d'avancement de la maladie d'Alzheimer. Une fois radio-synthétisé, ce nouveau radiotraceur est évalué *in vivo* chez le rat, afin de valider sa pharmacocinétique. Cette demande d'autorisation porte donc sur l'étude de la spécificité de la fixation de ce nouveau radiotraceur à sa cible biologique, par mise en compétition avec d'autres molécules connues. Nous pourrions ainsi étudier la bio-distribution cérébrale de cette enzyme. 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.

Le principe de la technique de compétition est d'empêcher la fixation du radiotraceur à sa cible en administrant à forte dose une molécule (compétiteur) ayant une affinité pour cette même cible. Les compétiteurs envisagés sont l'EHT-1610, l'Harmine, la Leucettine L41 et l'INDY. La voie d'administration du compétiteur est dépendante de la molécule utilisée, avec prédominance des voies intraveineuses (iv) et intrapéritonéales (ip). La comparaison de plusieurs compétiteurs est souvent nécessaire et un maximum de 4 compétiteurs pourra être utilisé pour caractériser un radiotraceur.

Remplacer : En amont des travaux chez l'animal, des tests d'autoradiographie *in vitro* seront réalisés sur coupes de tissus avec les compétiteurs et le radiotracteur afin de valider la méthode.

Réduire : Avant de débiter cette étude, des travaux préliminaires sont réalisés chez le rongeur afin de vérifier la faisabilité technique de l'utilisation de la molécule radio-marquée en imagerie TEP. De plus, durant l'étude, l'obtention de bons résultats avec un compétiteur peut être suffisant pour obtenir une preuve de concept fiable de la spécificité du marquage et y mettre fin. Enfin, les techniques d'imagerie permettent de valider un nouveau radiopharmaceutique avec un nombre limité d'animaux, en réduisant fortement le besoin de recourir aux méthodes *ex vivo*.

Raffiner : Tous les animaux sont hébergés en animalerie conventionnelle respectant leurs besoins physiologiques et comportementaux. Les caméras  $\mu$ TEP/ $\mu$ TDM et  $\mu$ TEP/ $\mu$ IRM ainsi que l'ensemble de l'environnement technique sont adaptés aux rats, permettant ainsi d'étudier *in vivo* le devenir d'une molécule tout en respectant leurs besoins physiologiques. Afin de limiter leurs mouvements durant l'imagerie et de maintenir des conditions physiologiques correctes, les animaux seront anesthésiés par voie gazeuse avec un monitoring de température et un suivi de la fréquence respiratoire. Un radiotracteur devant, par définition, être formulé en solution injectable et administré à dose « traceuse », c'est à dire sans effets biologiques ou radiologiques, aucune douleur n'est attendue suite à son administration. Le compétiteur peut être administré avant, en même temps ou après le radiotracteur et à une dose dont les potentiels effets biologiques n'entraînent pas de douleur, pas de stress, pas de perturbation de l'état général (respiratoire, cardiaque, ...) dans nos conditions expérimentales. Afin d'éviter tout risque d'effets secondaires liés aux compétiteurs, l'étude sera réalisée sans réveil. Les mises à mort, en fin de protocoles expérimentaux, se font par du personnel qualifié sous overdose d'anesthésie gazeuse.

De 5 à 15 animaux seront nécessaires pour l'évaluation d'un compétiteur, soit un maximum de 60 animaux pour 4 compétiteurs testés. Ces travaux nécessitent en effet un nombre restreint d'animaux par condition expérimentale (5 minimum) pour que les tests statistiques soient valides, 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.

**20014** L'objectif de ce projet est de mieux caractériser les atteintes vestibulaires (de l'équilibre) liées à une exposition acoustique. L'exposition au bruit à haute intensité constitue un aspect inévitable de nombreuses professions. Ces expositions peuvent entraîner des pertes auditives temporaires ou permanentes qui constituent une des causes majeures de troubles de l'audition. De récentes études ont montré que les pertes auditives permanentes s'accompagnent également de troubles de la fonction vestibulaire. Très peu de travaux ont été réalisés sur le plan électrophysiologique et histologique du système vestibulaire. A l'aide de nouvelles techniques d'analyses vestibulaires, nous souhaitons quantifier de manière précise les conséquences fonctionnelles et histologiques des expositions acoustiques au niveau du système vestibulaire. L'étude ainsi que la meilleure caractérisation des lésions vestibulaires provoqués sont une nécessité pour envisager, par la suite, un diagnostic plus précis ainsi qu'une meilleure prise en charge des personnes exposées au bruit à haute intensité. En effet, Les troubles de l'équilibre constituent un problème de santé croissant. En France, les troubles de l'équilibre constituent le troisième motif de consultation chez le médecin généraliste et représentent 5% des urgences hospitalières.

L'utilisation d'animaux dans ce projet est indispensable, les tests auditifs et posturo-locomoteurs ne peuvent être réalisés par des approches alternatives. Pour cela, l'utilisation de souris CBA/J nous permettrait de disposer d'un modèle animal stable représentant les atteintes de l'oreille interne. En effet, cette souche de souris possède un système auditif proche de celui de l'homme ainsi qu'une audition stable dans le temps. Pour être en accord avec la règle des 3 R et minimiser l'anxiété et la douleur chez ces animaux (Raffiner), l'ensemble des tests posturolocomoteurs, des enregistrements de potentiels évoqués et otoémissions acoustiques ont été choisies pour leur caractère faiblement invasif (placement d'électrodes sous-cutanées après anesthésie) et peu stressant. Le minimum d'animaux possible sera également utilisé (Réduire) 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, 200 animaux seront nécessaires, après estimation à l'aide de la formule de taille d'échantillon. Afin de mener à bien cette étude, 2 types d'expositions acoustiques seront étudiées (Légère et Forte) avec 7 points de mesures spécifiques qui ont été choisis dans le but d'avoir un suivi temporel (Basal, Trauma, 3 jours, 1 semaine, 2 semaines, 3 semaines et 4 semaines).

Pour les études comportementales et électrophysiologiques 10 animaux par types d'expositions (Légère, Forte et SHAM) sont nécessaires, soit 30 animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ces 30 animaux seront également utilisés pour les études immunohistochimiques, par conséquent le nombre d'animaux nécessaire reste à 200. Tous les animaux bénéficieront également d'un suivi quotidien dans le but de vérifier et prévenir les états de stress ou de douleur. Pour la vérification de ceux-ci, des critères d'évaluations des points limites sont utilisés. Les points limites sont divisés en deux catégories, absolu et déterminant. Les points limites déterminants entraîneront un suivi plus régulier (deux à trois fois par jour) accompagné de traitements antidouleurs. L'évolution en points limites absolus entraînera l'euthanasie de l'animal.

**20015** La sclérose en plaques est une maladie neurodégénérative auto-immune qui affecte le cerveau et la moelle épinière, les deux composantes du système nerveux central (SNC). Cette maladie neurodégénérative imprévisible est caractérisée par des poussées inflammatoires à la fois cause et conséquence d'une destruction de la substance blanche du SNC, et progressivement une destruction de la matière grise. Ces lésions chroniques induites par une dysfonction du système immunitaire provoquent des perturbations motrices, sensibles et cognitives. A plus ou moins long terme, ces troubles progressent vers un handicap irréversible. Avec plus de 100000 cas en France et 5000 nouveaux cas chaque année, elle est la première cause de handicap neurologique non traumatique chez le jeune adulte (<https://solidarites-sante.gouv.fr/>).

La thérapie par photobiomodulation (PBM) représente une stratégie thérapeutique innovante dans le traitement des maladies neurodégénératives.

Elle consiste à utiliser la lumière proche infrarouge pour améliorer les fonctions cérébrales. Elle a montré des propriétés antalgiques, anti-inflammatoires et cicatrisantes. L'un des effets les plus reproductibles est la réduction de l'inflammation en particulier au niveau cérébral, sans que le mécanisme d'action soit précisément connu. Le présent projet souhaite évaluer l'efficacité de la PBM comme traitement localisé de l'inflammation dans un modèle d'Encephalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), un modèle murin bien établi de sclérose en plaques. Ce projet est issu d'une collaboration de recherche entre i) une équipe académique, spécialisée dans l'imagerie intravitale dynamique des processus cellulaires dans les modèles de neuropathologies chez le rongeur et ii) une société, spécialisée dans le développement d'appareils de photothérapie permettant d'enrayer les cascades inflammatoires dans les maladies neurodégénératives. Ces appareils et leur protocole de stimulation sont évalués en phase 2 sur des cohortes de patients humains atteints de la maladie d'Alzheimer. Les travaux proposés ont pour objectif de définir -des paramètres de stimulation et -les fenêtres d'opportunité de traitement spécifiques à la pathologie -en investigant les effets de la photostimulation sur la dynamique et les interactions des composants cellulaires de la réponse inflammatoire dans un modèle murin préclinique de sclérose en plaque EAE. Cette étude tentera également de clarifier le mécanisme d'action cellulaire et systémique de la photobiomodulation pour faciliter l'optimisation des traitements cliniques.

Au total, un maximum de 600 souris transgéniques (C57/Bl6) âgées de 0 à 6 mois est prévu pour la globalité de l'étude. Celles-ci seront réparties en 30 groupes de 20 animaux. Un total de 7 procédures expérimentales seront réalisés.

Notre projet respectera la règle des 3 R (réduction, raffinement et remplacement):

-Réduction: Le principal avantage de ce projet au niveau de la réduction du nombre d'animaux d'expérimentation est l'utilisation d'un même animal pour plusieurs procédures expérimentales. En effet, la fenêtre spinale permet l'imagerie d'un même animal tout au long du protocole, ce qui réduit significativement le nombre d'animaux nécessaire. De plus, seulement le nombre minimal

d'animaux nécessaires à l'obtention d'un résultat statistiquement significatif sera utilisé. Comme établi dans la communauté scientifique, une significativité statistique de 5% est recherchée. Afin de réduire le nombre d'animaux par groupes tout en maintenant cette significativité, le test non paramétrique U-Mann Whitney, dédié à l'évaluation de petits échantillons, sera utilisé. Dans nos cas, étant donné une incertitude de l'ordre de 20% pour le protocole d'imagerie, une incertitude de l'ordre de 10% pour l'induction de l'EAE et une perte d'environ 10% à cause des différents points limites, il nous faudrait théoriquement des groupes de 20 animaux pour des quantifications à 5% près.

- Raffinement: Il est tout d'abord important de préciser que toutes les mesures permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux seront prises en compte. Pour le bien-être de l'animal, les souris seront hébergées de façon individuelle avec un enrichissement (copeaux de bois, dômes) avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau, un cycle de 12h jour - 12h nuit, une température et une humidité contrôlées. Les animaux sont vérifiés tous les jours, par des personnes non-stressées dont la compétence dans le domaine de l'expérimentation et du bien-être animaux sont reconnus par les autorités compétentes. La chirurgie d'implantation de fenêtre spinale et le protocole d'EAE pouvant amener des difficultés de déplacement aux animaux, du gel sucré énergétique (SAFE) est mis à disposition au fond de la cage pendant la procédure, afin d'assurer que l'animal a les apports énergétiques dont il a besoin. Les souris seront observées quotidiennement, en observant tout changement dans leur comportement ou l'apparition de signes cliniques de mal-être en nous appuyant sur une grille d'évaluation de la douleur. En cas de souffrance des animaux, lorsque les souris présenteront une perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids maximum de l'animal au delà de 2 jours ou en cas de signe clinique sévère (score 4) pendant plus de 2 jours ou de signe clinique très sévère (score 5) sans délais, les animaux seront mis à mort. De plus, une anesthésie générale est mise en place avant toute expérimentation, chirurgie ou imagerie, afin de s'assurer de l'absence de stress ou douleur chez l'animal. Aussi, la procédure thérapeutique de Photo Bio Modulation PBM envisagée pour cette étude est une procédure noninvasive appliquée en clinique.- Remplacement: Le protocole d'imagerie utilisé est la microscopie de fluorescence bi-photonique intravitale. Il est donc nécessaire d'étudier des animaux transgéniques (fond génétique: C57/Bl6) exprimant des marqueurs fluorescents. Or, la souris est actuellement le modèle mammifère qui offre le plus grand catalogue de sous populations cellulaires marquées en fluorescence. Nous avons donc choisi un modèle animal transgénique connu et caractérisé, ce qui évite de perdre de nombreux animaux en mise au point de protocole. Par ailleurs, le modèle expérimental EAE chez la souris permet de récapituler efficacement la pathologie humaine. C'est un modèle accepté et aux conséquences physiologiques bien connues de la sclérose en plaques. Enfin, les connaissances actuelles d'organisation de la moelle épinière chez la souris ainsi que de son comportement en font un modèle expérimental pré clinique de choix, dont les caractéristiques comportementales sont bien connues et permettent ainsi de mieux détecter toute douleur ou souffrance chez l'animal. Aucun remplacement n'est donc possible par des alternatives *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*.

**20016** La capacité du muscle à s'adapter à différents changements environnementaux est un phénomène complexe qui dépend de plusieurs facteurs, dont son état d'innervation. Plusieurs mécanismes sont impliqués dans la régulation de la masse musculaire. Cependant, beaucoup de zones d'ombre subsistent concernant les mécanismes cellulaires responsables des adaptations/inadaptations musculaires induites par la perte de masse musculaire associée à l'inactivité.

Les expéditions humaines de longue durée en apesenteur comme les séjours prolongés en orbite dans la station spatiale internationale provoquent une perte de masse musculaire induite par la microgravité. Cette atrophie musculaire intervient rapidement, dès le début de l'exposition à la microgravité, et elle s'aggrave ensuite au cours du temps. La perte de masse et de qualité du muscle est associée à une diminution de la force qui peut poser problème lors du retour à la gravité.

Le but de cette étude est de pouvoir limiter l'atrophie musculaire consécutive à une immobilisation / microgravité.

Notre précédente étude nous a permis de montrer que la protéine GDF5, jouait un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire. Dans ce nouveau projet, nous proposons de sur-exprimer le facteur GDF5 dans des muscles immobilisés de souris sauvages C57BL/6JRj et d'évaluer le potentiel thérapeutique du GDF5 à contrecarrer l'atrophie musculaire consécutive à l'inactivité.

**Remplacement:** 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.  
**Réduction:** Les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité. Néanmoins, 10 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires pour permettre une analyse statistique fiable, pour éviter que la variabilité des paramètres de mesures *in vivo* puisse empêcher la bonne exploitation des résultats. Les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et pour éviter de les répéter.

**Raffinement:** 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, un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum) et pas d'animaux isolés. 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. Pour limiter la souffrance et l'angoisse, les procédures qui le nécessiteront seront réalisées sous anesthésie et sous analgésiques. Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plateforme chauffante ou sous lampe radiante. Les animaux seront ensuite suivis quotidiennement afin de relever le moindre signe de souffrance.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 560 souris C57BL/6JRj)

**20017** Ce projet pédagogique permettra aux étudiants d'étudier les effets pharmacologiques de substances actives sur le cœur isolé de rat. Après anesthésie de l'animal, le cœur battant sera prélevé par l'enseignant, puis monté dans une cuve adaptée à enregistrement de paramètres cardiaques et pourvoir ensuite étudier les effets directs de substances pharmacologiques. Ce nouvel enseignement pratique a remplacé l'expérimentation qui s'effectuait sur le rat anesthésié par l'étude des effets pharmacologiques sur un organe isolé.

Les avantages de la mise en place de cette nouvelle approche expérimentale par rapport à celle actuellement employée sont les suivants :

1) Réduction considérable du nombre d'animaux à sacrifier par année universitaire : 30 rats pour le cœur perfusé contre 60 rats pour l'approche *in vivo*, car grâce cette nouvelle approche expérimentale, 18 de ces animaux seront mutualisés pour réaliser d'autres travaux pratiques effectués dans le laboratoire le même jour. Au final, 48 rats seront épargnés avec ce nouveau protocole expérimental (30+18 = 48 rats), cela signifie une utilisation de 150 rats pour les prochaines années. D'autre part, la majorité des animaux utilisés proviendront d'animaux surnuméraires (sexe et âge indifférents) récupérés dans des animaleries proches du laboratoire (moins de 5 min),

2) L'expérimentation sur l'animal anesthésié qui était en place (pose de cathéters, canules, accidents opératoires, hémorragies, décès précoces) pouvait être psychologiquement traumatisante pour certains étudiants même si ce travail expérimental était effectué seulement par des étudiants volontaires. En effet, les réfractaires à l'expérimentation animale avait la possibilité de travailler sur un autre modèle expérimental qui permet d'étudier les effets pharmacologiques d'un autre principe actif.

3) Les résultats *in vitro* sont plus reproductibles et plus facilement interprétables par les étudiants car il s'agit d'un système moins intégré que l'animal entier et donc moins complexe dans l'interprétation des résultats.

4) La mesure de nouveaux paramètres cardiaques sur cœur isolé (contraction myocardique) et la détermination de la fréquence cardiaque sera plus précise par cette expérimentale que celle mesurée sur l'animal anesthésié.

Ces arguments nous encouragent fortement à remplacer l'enseignement pratique *in vivo* par cette approche expérimentale *ex vivo* qui répond au mieux aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

**20018** Notre projet de recherche est focalisé sur le cancer du pancréas. Il n'existe aucune thérapie curative efficace de ce cancer rare très invasif et chimiorésistant. La mécanistique de signalisation cellulaire peut être analysée dans des lignées cellulaires pancréatiques cancéreuses mais l'environnement de ce cancer, l'hétérogénéité cellulaire intra-tumorale qui le caractérise, le système immunitaire de l'hôte, l'environnement au sens large et la réponse au traitement ne peuvent être reproduits que par l'utilisation de modèles animaux. Notre projet a pour objectif découvrir grâce à ces modèles de nouvelles thérapies contre le cancer du pancréas. Nous utiliserons des cellules humaines greffées chez les souris athymiques pour étudier les cibles moléculaires dans la cellule cancéreuse pancréatique, et également des modèles immuno compétents de cancer pour mieux comprendre l'importance du système immunitaire dans la réponse antitumorale.

Les allo- et xénogreffes chez la souris immuno-déficiente ou immuno-compétente sont, pour des raisons d'accessibilité, de coût et de réduction du nombre d'animaux, l'outil de prédilection pour les tests pré-cliniques. Les cohortes sont de 10 souris maximum par condition.

Les procédures expérimentales du projet (chirurgie, injection d'agents pharmacologiques ou de contraste) seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur, leurs conditions d'hébergement et l'enrichissement de leur environnement seront validés par la cellule bien-être. La douleur ou l'état de stress seront évalués lors du suivi quotidien du comportement des animaux. Si nécessaire l'animal sera soulagé par un analgésique dont le type et la dose seront définis en fonction des paliers de douleur. La perte de poids supérieure à 20%, l'arrêt de l'alimentation, la baisse de la température corporelle ou un mutisme durant plus de 24h, la présence d'une masse tumorale ou de métastases > 10mm de côté conduiront à l'arrêt de l'expérimentation et à la mise à mort de l'animal.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 960 animaux.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

1-Remplacement : le recours à l'expérimentation animale se fait après de nombreuses études *in vitro*

2-Réduction : nous utiliserons des tests statistiques afin de valider nos résultats et de limiter le nombre d'expériences.

3-Raffinement : les animaux seront suivis quotidiennement et seront placés sous Structure du Bien-Être Animal (SBEA) pour les procédures classées modérées (chirurgie, prélèvement et injections). Un analgésique sera utilisé dès que nécessaire et des croquettes seront placées dans la cage pour faciliter la récupération post-procédure. Les animaux seront sacrifiés lorsque le volume d'une tumeur sera supérieur ou égal à 1 cm cube, mais également, si l'animal présente un des points limite (léthargie, pelage hirsute, perte de poids de plus de 20% ou tout autre comportement anormal grave). Ceci conduira à l'arrêt immédiat de l'expérimentation pour cet animal. Les personnes responsables des projets ont été formées et maîtrisent les gestes techniques utilisés. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé de manière non-invasive et longitudinale, ce qui limite grandement le nombre d'animaux utilisés par groupe.

**20019** La fragmentation des écosystèmes est un des principaux facteurs responsables de l'érosion de la biodiversité. Suite à la Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques, de nombreux obstacles en rivière doivent faire l'objet de mises en conformité pour rétablir la libre circulation des poissons. Contrairement à certaines passes-à-poissons parfois espèce-sélectives, les rampes à

macrorugosités peuvent convenir à un large spectre d'espèces aux capacités de nage variées. Des études hydrauliques ont permis d'établir certains critères de conception mais le comportement réel des poissons dans ces dispositifs n'a encore pas été étudié. Il est aujourd'hui nécessaire de mener des tests directement sur les poissons (R-remplacement), afin de définir les configurations (pente, formes des macrorugosités) les plus favorables au franchissement d'un maximum d'espèces. Pour répondre à cet objectif, des tests de franchissabilité avec différentes espèces de poissons seront réalisés en laboratoire, dans un canal expérimental aménagé en rampe à macrorugosités, permettant de varier les conditions expérimentales (pente longitudinale, forme des plots, rugosité de fond).

Deux espèces de fond (barbeau fluviatile, goujon) et deux espèces de pleine eau (chevaine, spirilin) ont été retenues pour ces tests. Leurs capacités de franchissement et leurs comportements différents permettent d'obtenir des résultats transposables à un cortège d'espèces variées et plus ou moins sensibles, sans multiplier à l'excès les tests sur un grand nombre d'espèces différentes. L'usage de poissons sauvages est nécessaire car les poissons de pisciculture ont des capacités de nage altérées. Le projet se déroulera sur plusieurs semaines d'expérimentation indépendantes. Au début de chaque semaine, les espèces cibles seront prélevées en rivière par pêche à l'électricité et seront transportées au laboratoire. Le lendemain, les individus seront anesthésiés puis mesurés, pesés et marqués par transpondeurs (12 mm) par incision ventrale dans la cavité abdominale. Ce type de marquage, peu invasif, est nécessaire pour identifier chaque individu au cours de l'expérimentation. Les tests de franchissement seront conduits au cours des trois jours suivants dans le canal expérimental, équipé de six antennes de détection pour suivre la progression des poissons. A la fin de la semaine, les poissons seront relâchés dans le milieu naturel. Comme il n'est pas possible de récupérer les marques sans mettre en danger ou euthanasier les individus, les transpondeurs se retrouvent dans le milieu naturel avec les poissons. Cependant, leur très petite taille, associée au fait qu'elles sont encapsulées dans du verre et qu'elles ne disposent pas de batterie, limite l'impact écologique d'une telle opération.

Plusieurs pentes (de 3 à 7%), 2 formes de macrorugosités (plots cylindriques et carrés) et le rôle de la rugosité de fond seront testés. Chaque configuration de pente sera tout d'abord testée avec des plots cylindriques et 30 individus de chaque espèce (9 configurations \* 30 individus = 270 individus par espèce). 4 pentes, dites pentes d'intérêt, pour lesquelles un changement du franchissement sera observé, seront ensuite confirmées avec 30 autres individus (4 pentes \* 30 individus = 120 individus par espèce). Chacune des 4 pentes d'intérêt sera également testée avec des plots carrés et 60 individus par espèce (4 pentes \* 60 individus = 240 individus par espèce). Puis la forme la plus favorable des plots sera de nouveau testée pour les 4 pentes d'intérêt mais sans rugosité de fond, avec 60 individus par espèces (4 pentes \* 60 individus = 240 individus par espèce). Ainsi, au maximum, 3480 poissons seront nécessaires pour le besoin de l'étude ((270+120+240+240) \* 4 espèces). Chaque test de franchissement, effectué par groupe de 10 poissons, durera 40 minutes au total (10 minutes d'acclimatation dans la zone d'accueil + 30 minutes de nage). Le comportement des poissons holobiotiques (non-migratrices) et leur motivation à nager vers l'amont dans un écoulement confiné du canal expérimental est difficilement prévisible. C'est pourquoi les poissons qui resteront dans la zone d'accueil au cours du test seront incités au mouvement par effarouchement au bout de 10 et 20 minutes. Tous les individus seront continuellement observés. En cas de difficulté de nage, l'individu sera immédiatement sorti du canal et remis en stabulation. Chaque individu ne sera utilisé qu'une fois. La stratégie expérimentale mise en place rend possible une réduction du nombre d'individus testés (R-réduction). Les tests débiteront par la pente à 4%, puis le plan expérimental sera ajusté en fonction des résultats obtenus, selon le principe suivant : l'échec de franchissement d'une pente donnée annulera les tests pour les pentes supérieures. Et inversement, le succès de franchissement d'une pente donnée annulera les tests des pentes inférieures.

Les durées de stabulation (5 jours) et d'expérimentation (40 minutes) sont très réduites (R-raffinement). Lors de la stabulation (densité < 20g de poissons/L), la surveillance des animaux et des conditions physico-chimiques sera biquotidienne. Les poissons ne seront pas nourris pour



prévenir toute dégradation de la qualité de l'eau. Le dérangement et la luminosité naturelle seront réduits pour diminuer le stress des poissons.

**20020** Les amyloses sont des maladies rares très sévères avec une forte létalité. Les malades présentent des dépôts de fibrilles amyloïdes extracellulaires qui augmentent avec l'âge et perturbent le fonctionnement des organes. Les organes les plus touchés sont le rein, le cœur, le foie et la rate. La mort survient le plus souvent avant 50 ans, par insuffisance rénale terminale ou insuffisance cardiaque. Actuellement il n'existe pas de traitement des amyloses héréditaires. Les fibrilles amyloïdes sont formées par le mauvais repliement de protéines circulantes. Le plus souvent, ce sont des protéines mutées, ce qui donne les amyloses héréditaires. Le but de ce projet est de tester des molécules dégradatrices des fibrilles dans un modèle transgénique murin d'amylose systémique à hérédité autosomale dominante. Ces souris présentent un phénotype très similaire à la pathologie humaine: amylose rénale, cardiaque et hépatique, présence de dépôts amyloïdes dans l'intestin et la rate. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement.

Remplacement : Ce projet nécessite l'implication d'animaux vivants car il est actuellement impossible de reconstituer les organes tels que rein, cœur et foie *in vitro/ ex vivo* du fait de leur complexité. Nous testerons deux molécules validées *in vitro* pour leurs capacités de reconnaître et dégrader spécifiquement des protéines mal repliées et leurs agrégats. L'objectif est d'établir si ces molécules sont efficaces *in vivo* chez les souris transgéniques.

Réduction: Ce projet de la durée maximale de 2 ans prévoit des expériences de traitement de 3 semaines des souris avec chacune des 2 molécules et à deux âges différents. Ce projet nécessitera au maximum 72 souris immunocompétentes transgéniques. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux témoins. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation.

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 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, 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 et des soins adaptés. 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.

**20021** Avec l'allongement de l'espérance de vie, les pathologies osseuses telles que l'ostéoporose et l'arthrose représentent un problème de santé publique important. La perte osseuse ou ostéoporose touche principalement les femmes post-ménopausées et augmente drastiquement le risque de fractures. L'arthrose correspond à une atteinte du cartilage très douloureuse affectant 4.6 millions de patients en France. Actuellement, les prises en charge thérapeutiques pour ces pathologies s'avèrent peu efficaces au long terme et conduisent à s'intéresser à de nouvelles cibles cellulaires. Les adipocytes de la moelle osseuse -qui se développent au cours de ces pathologies et libèrent plusieurs facteurs modifiant le remodelage osseux (équilibre entre la résorption par les ostéoclastes et la formation osseuse par les ostéoblastes) - deviennent des cibles cellulaires particulièrement pertinentes en vue d'améliorer le diagnostic évolutif et/ou le traitement de ces pathologies. Or l'étude des interactions complexes entre compartiment osseux et adipocytes médullaires ne peut être étudiée qu'*in vivo*. Dans ce cadre, deux modèles murins obtenus par chirurgie ont déjà été bien caractérisés : le modèle d'ovariectomie (Ovx) reconnu pour mimer l'ostéoporose post-

ménopausique et le modèle de déplacement du ménisque médian (DMM) reconnu pour mimer l'arthrose du genou. Notre caractérisation nous a permis de déterminer la cinétique de développement des adipocytes médullaires et l'évolution de leur phénotype en lien avec certaines altérations du remodelage osseux propres à chacun de ces modèles.

Parmi les facteurs régulant les activités des adipocytes médullaires, le développement d'une hyperglycémie chronique telle qu'observée dans le diabète se révèle comme un facteur métabolique potentiellement crucial dans ces contextes physiopathologiques. Ainsi plusieurs études cliniques ont mis en évidence que la présence d'une hyperglycémie chronique s'accompagne d'une augmentation de l'adiposité médullaire chez des patientes ménopausées et des patients avec un diabète de type 2 qui présentent aussi une fragilité osseuse. L'obésité et ses co-morbidités dont le diabète de type 2 constituent aussi des facteurs de risque dans l'arthrose. Nos études *in vitro* menées sur des adipocytes différenciés de cellules mésenchymateuses de donneurs de moelle osseuse ont permis d'identifier plusieurs facteurs en relation avec le remodelage osseux et le métabolisme dont la synthèse est modifiée lors d'une exposition chronique à une concentration élevée de glucose mimant une hyperglycémie chronique sévère. Le présent protocole vise donc à confirmer *in vivo* l'implication de l'hyperglycémie chronique sur le développement et les activités des adipocytes médullaires et leur impact sur le compartiment osseux dans nos deux modèles murins.

Après chirurgie, un traitement pharmacologique (Dapagliflozine) sera administré pour réduire les perturbations de la glycémie observées dans le modèle d'ostéoporose post-ménopausique. Afin d'étudier au long terme les effets d'un tel traitement, deux temps de traitement (5 et 11 semaines) seront étudiés. Dans le modèle d'arthrose, un autre type de traitement pharmacologique (streptozotocine) sera administré pour déclencher une hyperglycémie modérée. Un seul temps d'analyse (4 semaines) sera étudié dans ce modèle dans un souci de réduction. Plusieurs tests légers permettront de confirmer les modifications de la glycémie au cours des traitements. A terme, les différents échantillons osseux et médullaires seront analysés par différentes approches pour analyser la quantité et la qualité osseuses.

Ce projet comporte donc 8 groupes expérimentaux : deux modèles chirurgicaux (Ovx, DMM), et leurs contrôles respectifs (opération fantôme pour l'Ovx et pour la DMM), avec 2 traitements (Dapagliflozine pour le modèle Oxv, Streptozotocine pour le modèle DMM) à différents temps d'analyses. 184 souris au total seront nécessaires pour ce protocole.

Méthodes mise en œuvre pour le « Remplacement » :

Des approches *in vitro* et moléculaires (à partir de cellules humaines médullaires ou isolées d'échantillons humains obtenus lors de poses de prothèse) sont aussi employées pour ces études mécanistiques et cibler au mieux les approches mises en œuvre *in vivo*.

Méthodes mise en œuvre pour la « Réduction » :

Plusieurs échantillons déjà obtenus lors du précédent protocole seront réutilisés pour la réalisation de ce projet. Seuls sont prévus les animaux nécessaires pour contrôler ou générer de nouveaux échantillons ou de nouvelles approches.

Méthodes mise en œuvre pour le « Raffinement », atténuer la souffrance et améliorer le bien-être des animaux :

Les conditions d'hébergement comprennent un enrichissement du milieu à base de ouate compressée à effiloche. Les souris sont acclimatées à leur environnement avant toute intervention. Les interventions chirurgicales sont réalisées sous anesthésie- analgésie appropriée et dans des conditions agréées. Le suivi post-opératoire des souris est quotidien pendant 15 jours puis hebdomadaire. Ces interventions chirurgicales n'empêchent pas la mobilité de la souris et les douleurs post-opératoires sont prises en charge. Le traitement quotidien à la Dapagliflozine n'entraîne ni douleur, ni toxicité. Le traitement par la streptozotocine sera réalisé sur 5 jours avec des doses faibles et non létales et sera associé à un suivi quotidien des animaux la première semaine puis bi-hebdomadaire. Si une mauvaise cicatrisation suite à la chirurgie ou tout autre signe

de souffrance devait être détecté et ne puisse être corrigé par les moyens appropriés, la souris concernée serait mise à mort.

**20022** De nombreux médicaments antipsychotiques et antiépileptiques utilisés pour le traitement des patients psychiatriques ont des effets stimulateurs d'appétit spectaculaires, entraînant une prise de poids rapide, un surpoids, une obésité et un syndrome métabolique. Les patients recevant ces traitements sur le long terme peuvent développer un syndrome métabolique persistant et être ainsi affectés par une réduction de l'espérance de vie de 10 à 20 ans. Il est donc important d'étudier ces phénomènes et de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il a été récemment montré que certaines protéines pouvaient avoir un impact sur l'appétit et être un stimulateur lipogénique (fabrication de graisses) chez la souris. Ces protéines agissent sur les protéines GABAAR (récepteur de type A de l'acide gamma-aminobutyrique (GABA)). Un polymorphisme du GABAAR (forme particulière : rs279858) prédispose les patients à une prise de poids après un traitement aux antipsychotiques. C'est pourquoi, nous aimerions étudier le rôle de ces stimulateurs de l'appétit dans les effets secondaires liés à la prise de médicaments antipsychotiques et antiépileptiques. Nous utiliserons différentes modalités pour la prise des médicaments comme des injections ou des prises orales. Nous effectuerons au cours des expériences des prélèvements sanguins.

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 (règle des 3 R). Remplacement (remplacer les modèles animaux par d'autres modèles lorsque cela est possible): L'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier les effets des traitements antipsychotiques sur le métabolisme d'un organisme vivant. Cet environnement est impossible à reproduire dans toute sa complexité et dans sa régulation *in vitro* ou *ex vivo*. Réduction (réduire le nombre d'animaux utilisés pour les expériences): Ce projet se dessine sur 5 ans. Nous utiliserons des souris immunocompétentes (maximum de n. = 5640). Le nombre de souris a été déterminé avec le logiciel "InVivoStat ». 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 tests statistiques utilisés seront des tests « LogRank » pour la survie, et des tests « Anova » ou des « t » tests pour la perte ou la prise de poids.

Raffinement (Raffiner la méthodologie utilisée, afin de supprimer, réduire, soulager la douleur ou la détresse des animaux) : 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 nids végétaux, de maisonnettes et de bâtonnets à ronger dans les cages). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi stricte des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature.

**20023** Au cours de la vie, le Système Nerveux Entérique (SNE) est soumis à un remodelage continu en réponse à des facteurs environnementaux mais également lors de certaines conditions physio/pathologiques comme au cours du vieillissement normal et/ou pathologique. Bien que dans les dernières années, plusieurs études ont démontré des altérations dans les cellules nerveuses entériques lors du vieillissement et dans certaines pathologies neurodégénératives tel que la maladie de Parkinson, les mécanismes cellulaires et moléculaires à la base de ces altérations restent encore mal compris avec des données très restreintes et parcellaires. Récemment un nombre grandissant de données suggère qu'un dysfonctionnement des zones de contact entre le

réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries serait largement impliqué à la fois dans le vieillissement physiologique mais aussi pathologique. Ces zones de contacts mitochondrie/RE sont appelées « mitochondria- associated ER membranes » ou MAM. Etant donné, l'implication des MAM dans une grande majorité des fonctions neuronales, notre hypothèse est qu'une perturbation des MAM dans le SNE puisse engendrer un remodelage majeur de ce dernier et par conséquent induire d'importantes dysfonctions gastro-intestinales ayant potentiellement un fort impact sur les fonctions du SNC. A ce jour, aucune étude ne s'est penchée sur le rôle des MAM dans la régulation des fonctions du SNE et l'implication des MAM dans les processus de vieillissement du tube digestif qu'il soit physiologique ou pathologique comme dans la maladie de Parkinson.

Le but de ce projet est de comprendre en détail le rôle des MAM sur le fonctionnement du système nerveux entérique. Les objectifs de ce projet sont :

I)- étudier le rôle des MAM dans la régulation des fonctions cellulaires du SNE ainsi que les grandes fonctions biologiques du tube digestif (perméabilité et motricité intestinale).

II)- étudier l'effet du vieillissement physiologique ou pathologique, notamment au cours de la maladie de Parkinson sur la biologie de MAM dans le SNE.

Pour cette étude nous utiliserons des souris transgéniques invalidées pour une molécule de régulation clé des MAM, un modèle de vieillissement accéléré et de vieillissement pathologique soit 360 animaux au total. Le nombre de 360 animaux est estimé comme le minimum d'animaux nécessaire pour permettre d'obtenir une puissance statistique suffisante. Ce nombre est justifié par rapport à la littérature de la discipline et permettra de générer 2 séries d'expériences indépendantes.

Dans l'ensemble, les animaux utilisés dans ce projet seront soumis uniquement à des procédures expérimentales dites « légères ». 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 frisois. L'état général des animaux sera quotidiennement évalué, et des points limites seront mis en place.(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.

**20024** Le cancer du foie est une maladie grave dont le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter ces dernières décennies. En 2011, plus de 8000 nouvelles personnes ont été touchées par cette maladie en France. Une étude effectuée entre 1999 et 2005, estime que le taux de survie des patients à 5 ans, après la pose du diagnostic, était seulement de 13%. D'après une étude préliminaire menée au sein de notre laboratoire, nous avons découvert que la surexpression d'un facteur de régulation des ARN était corrélée à un faible taux de survie à 5 ans de ces patients.

Malgré les preuves de plus en plus nombreuses montrant que des défauts d'expressions de ce facteur mènent au développement de pathologies humaines, à ce jour, aucun traitement bloquant ce facteur n'est utilisé comme cible thérapeutique contre le cancer du foie.

Nous disposons dans notre laboratoire de différentes molécules capables d'inhiber l'activité de ce facteur. Récemment, une étude a prouvé que cette inhibition avait un effet bénéfique sur un autre type de cancer, le sarcome. Ces nouvelles molécules représentent donc une excellente approche novatrice pour traiter le cancer du foie.

Ce projet a pour but premier d'analyser l'impact de ces nouvelles drogues sur le développement et la progression tumorale. Pour cela, nous utiliserons un modèle de tumeur hépatique sur des souris immunocompétentes. Nous comparerons le développement tumoral entre les souris traitées ou non traitées par nos molécules. Ce projet permettra dans un second temps également grâce à une étude scientifique sur les tumeurs, menant conjointement des analyses histologiques, biochimiques et de biologies moléculaires, d'apporter de nouvelles connaissances sur les mécanismes sous-jacents impliqués.

La conception de ce projet est réalisée dans le respect de l'application du principe des 3R et à travers une démarche éthique.

Remplacer: De nombreux types cellulaires et de régulations systémiques interviennent dans le processus cancéreux hépatique rendant ainsi non réalisable une étude *in vitro*. En effet, les lignées issus d'hépatocarcinome ne permettent pas à elles seules de reproduire l'ensemble du processus. Raffiner: Un suivi quotidien des animaux sera réalisé. Dans le but de réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse, nous utiliserons des anesthésiants et/ou des analgésiques selon les procédures décrites dans ce projet.

Les animaux seront hébergés en groupe avec un enrichissement du milieu.

Réduire: Un calcul des effectifs nécessaires, basé sur une variable biologique simple (taille de la tumeur) nous permettra d'atteindre une significativité des résultats avec un minimum d'animaux. Notre approche statistique est basée sur la comparaison de deux moyennes. La procédure 1 permet de tester les différents modes d'administrations. Le meilleur mode d'administration sera utilisé pour les procédures 2 et 3.

Le nombre de souris nécessaire pour cette étude est de : 220 souris

**20025** Les études chez l'humain montrent un lien étroit entre les facteurs de risque vasculaires tels que l'hypertension, l'obésité ou le diabète sucré avec les problèmes de cognition et de démence. Ils sont associés à une maladie touchant les petits vaisseaux dans le cerveau. L'ensemble des petits vaisseaux constituent une barrière hémato-encéphalique dans le cerveau. La barrière hémato-encéphalique crée ainsi une barrière physiologique entre la circulation sanguine et le système nerveux central. Elle sert à réguler le milieu dans le cerveau, en le séparant du sang. Le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique est essentiel au bon fonctionnement neuronal. Lorsque cette intégrité est altérée, la fonction de barrière est compromise, ce qui peut initier des problèmes de dégénérescence neuronale. On parle alors de démence vasculaire. Ainsi, il est important de comprendre les mécanismes cellulaires régulant les fonctions physiologiques de la barrière hémato-encéphalique. Nos objectifs sont maintenant de définir comment les comorbidités telles que l'hypertension, affectent le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique et d'analyser leur lien avec l'apparition des troubles cognitifs. Ce projet utilisera des modèles murins de souris mutées génétiquement pour des cibles régulant la fonction de la barrière hémato-encéphalique.

Pour répondre à cette problématique, nous développerons plusieurs modèles pathologiques chez la souris créant une hypertension modérée ou sévère soit par une diffusion continue d'un vasoconstricteur puissant, soit par un régime riche en sel (chlorure de sodium) car chez l'homme, les régimes riches en sel sont depuis longtemps associés à l'hypertension artérielle, soit par un modèle chirurgical associant une ablation partielle du rein avec un régime riche en sel.

Les souris, génétiquement modifiées pour des gènes candidats nécessaires au maintien de la barrière hématoencéphalique, seront soumises à ces modèles pathologiques d'hypertension. Nous analyserons les conséquences sur les troubles de comportement, la pression artérielle systémique, et centrale et l'apparition des marqueurs de dégénérescences neuronales. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences un total de 768 animaux.

Dans le respect de la règle des 3R, nous nous efforcerons de réduire le nombre d'animaux dans nos expériences. Pour réduire le nombre d'animaux, le fait de tester les souris avant et après traitement hypertensif permet de diminuer les lots des souris testées en augmentant la puissance statistique. De plus, les animaux seront inclus à chaque temps dans plusieurs protocoles pour réduire le nombre des animaux (tests de comportement, suivi des pressions systémiques, suivi par échographie cardiaque, suivi du flux sanguin cérébral seront réalisés sur chaque animal inclus dans le projet). Le nombre d'animaux a été calculé par rapport aux questions posées et au nombre optimal pour valider statistiquement les résultats quantitatifs. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Pour réduire la souffrance/l'angoisse, un suivi quotidien est assuré : les animaux sont hébergés en

animalerie conventionnelle en cage collective sur portoir ventilé, sur de la litière enrichie avec un igloo (maison en carton permettant de créer des abris pour les animaux). L'eau et la nourriture sont fournies à volonté. Après chirurgie nous surveillons les animaux dans une pièce dédiée pendant 24 heures et plaçons dans la cage des souris des sachets de nourritures enrichie et hydratée. Parallèlement à ce protocole, des études seront réalisées sur des cellules de endothéliales humaines en culture, exposées ou non à des vasoconstricteurs. Ce remplacement du modèle animal par un modèle *in vitro* permettra d'élucider certains mécanismes intracellulaires sans utiliser d'animaux. Notre projet prend en compte le respect des animaux et la participation aux conditions d'enrichissement dans les cages.

**20026** Ce projet présente les travaux pratiques effectués sur les animaux par des étudiants inscrits depuis au moins 1 an dans une filière scientifique à dominante physiologique. Ces travaux pratiques de licence de SVT (Sciences de la Vie et de la Terre) sont répartis dans 2 unités d'enseignement (UE):

- l'UE "Physiologie de la digestion et de l'excrétion"
- l'UE "Physiologie cardio-vasculaire et respiratoire"

Ces 2 UE sont enseignées en deuxième et troisième année de licence et doivent permettre à des étudiants avertis, formés à la théorie, d'étudier *in vivo* des grandes fonctions physiologiques que sont la digestion, l'excrétion et la respiration. Au préalable, les étudiants sont sensibilisés au cadre réglementé de l'expérimentation animale en étant formé au bien-être animal, à l'éthique et à la règle des 3R avec des TD de Bioéthique dispensés en deuxième année de licence.

Dans chacun de ces modules, les étudiants vont se familiariser à manipuler le rat anesthésié, à respecter son bien-être (participer à la surveillance de l'analgésie et de l'anesthésie de l'animal qui leur est confié) et aussi à maîtriser les techniques de dissection et de cathétérisation. Cet apprentissage est nécessaire aux étudiants pour bien aborder l'expérimentation sur l'animal et pour leur donner le souci du raffinement (diminuer le stress et la douleur des animaux). Le nombre de travaux pratiques sur l'animal a été largement réduit par rapport aux années précédentes et le nombre d'animaux est réduit au minimum (1 seul rat pour 2 étudiants et par séance). Une seule séance de travaux pratiques sur animaux a été conservée pour chaque UE. Le nombre maximum de rats utilisés pour l'UE "Physiologie de la digestion et de l'excrétion" sera de 96 animaux / an et de 48 animaux / an pour l'UE "Physiologie cardio vasculaire et respiratoire".

Le nombre total d'animaux requis pour 5 ans est donc de 720 rats. Ces animaux seront hébergés dans les conditions réglementaires et leur bien-être est une priorité (acclimatation, enrichissement, surveillance quotidienne, change régulier, nourriture et boisson à volonté).

De nombreuses séances de travaux pratiques de physiologie sont faites en simulation dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales. Cependant, rien ne peut remplacer l'expérimentation animale qui est incontournable dans de nombreux domaines de la recherche biologique tels que l'étude des grandes fonctions physiologiques.

**20027** Malgré des progrès dans le traitement de nombreux cancers, les résistances à certains agents thérapeutiques, les rechutes ou l'absence de traitements efficaces dans certains cas font que les cancers au sens large sont encore un problème majeur de santé publique nécessitant le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Dans ce contexte, le développement et l'amélioration des techniques de production/modification d'anticorps permettant aujourd'hui d'obtenir de manière rapide et efficace des anticorps de spécificités souhaitées laissent entrevoir de réels espoirs. En effet, l'utilisation seule ou en combinaison avec des traitements déjà existants, de nouveaux anticorps à visée thérapeutique ont déjà été couronnés de succès cliniques importants ou très prometteurs (Herceptin, Adcetris, Ipilimumab, Nivolumab), ce qui en fait une stratégie efficace de choix et en plein essor, notamment dans la lutte contre le cancer.

Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans ce cadre, à savoir qu'il a pour objectif de pouvoir tester les effets thérapeutiques anti-tumoraux potentiels d'anticorps candidats médicaments en induisant des tumeurs spontanées par l'injection d'un carcinogène en sous-cutanée.

Il consiste au développement et à l'utilisation dans notre animalerie de modèles inductibles par injection ou administration d'un carcinogène, dans le respect de la règle des « 3R ». Ces modèles murins sont indispensables pour permettre l'évaluation de l'effet thérapeutique anti-tumoral et ainsi déterminer le candidat médicament le plus prometteur. Ils constituent une première étape essentielle et incontournable avant le transfert vers la clinique de candidats médicament. Ils sont largement décrits dans la littérature et ne peuvent aujourd'hui être remplacés à ce stade des études précliniques par aucune autre méthode satisfaisante.

De ce fait, les mesures permettant de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, leur souffrance et leur angoisse seront prises, comme par exemple :

-Ne seront injectés aux souris que les anticorps pour lesquels un effet thérapeutique des anticorps aura été observé *in vitro*.

-Le nombre d'animaux nécessaires par lot par expérience sera calculé en se basant à la fois sur les données de la littérature, des expériences « pilotes » et un test statistique de puissance.

-Le suivi du développement de pathologies et/ou de l'effet des anticorps testés sera évalué au cours du temps par des méthodes peu invasives.

-Dès qu'un animal atteindra un des points limites définis, il sera mis à mort selon la méthode recommandée.

-Les animaux seront hébergés dans des cages avec de l'enrichissement et adaptées pour contenir 5 individus et ainsi minimiser le stress de l'isolement.

Dans ces conditions, pour les 5 ans du projet, le nombre maximum estimé d'animaux utilisés sera de 3 240 souris, répartis parmi les souches de souris suivantes : C57BL/6N, BALB/c, transgéniques Tg21 sur fond C57BL/6N.

**20028** La neuromodulation thérapeutique est aujourd'hui employée chez l'Homme lorsque des approches médicamenteuses et/ou chirurgicales sont inefficaces ou impossibles à mettre en œuvre notamment pour traiter l'épilepsie.

Notre projet vise la validation d'un nouveau prototype de neuromodulateur adaptatif. Par adaptatif, il faut entendre que le neuromodulateur modifie constamment sa stimulation en fonction de l'état de certains paramètres mesurés en temps réel sur le patient.

Le pentylènetétrazol (PTZ) est le convulsivant le plus classique employé en recherche expérimentale. Valider l'effet d'un anti-convulsivant (AED) passe toujours – c'est une référence quasi-absolue – par montrer que l'AED permet d'atténuer ou de supprimer l'effet du PTZ. Il a été montré dans les années 90, qu'une stimulation vagale (VNS) appliquée à un rat permet de réduire la durée des convulsions consécutives à l'action du PTZ. Dans le cas initial, l'expérimentateur est seul décisionnaire du moment d'action de la VNS. Notre projet vise à évaluer si notre neuromodulateur adaptatif automatisé sur un critère électroencéphalographique (EEG) peut reproduire ou améliorer l'effet de la VNS quand l'expérimentateur est seul décisionnaire.

Pour ce faire, nous constituerons deux groupes de 14 rats chacun. Des électrodes corticales, cardiaques et vagales seront implantées sous anesthésie générale à chacun des 28 rats, Toujours sous l'effet de l'anesthésie générale, les 28 rats recevront une injection de PTZ. Selon le groupe, soit les rats seront sujets à des VNS automatiques, soit ils ne recevront pas de VNS. Nous comparerons les deux groupes pour évaluer si la VNS a apporté un gain se traduisant par une diminution de la durée des crises visibles à l'EEG.

Remplacement : l'essentiel du travail de mise au point du neuromodulateur a été réalisé par calculs sur ordinateur. Il reste cependant strictement nécessaire que des validations soient réalisées par

des tests expérimentaux avec un nombre limité d'animaux. Le test consistant à évaluer l'effet de la VNS adaptative sur l'effet convulsivant du PTZ est une épreuve incontournable de validation.

Réduction : Le nombre total de rats utilisés dans ce projet est réduit à 28 rats car de nombreux tests de vérification et d'optimisation ont été réalisés sur ordinateur avec des modèles informatiques reprenant les propriétés électrophysiologiques du système cardiaque couplé à de la stimulation nerveuse.

Raffinement : Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie et analgésie par un personnel formé et compétent pour ce type de chirurgie afin de limiter au mieux la douleur induite par celle-ci et de permettre une récupération plus rapide des animaux.

En complément du suivi régulier des animaux hébergés dans l'animalerie de notre laboratoire, un soin particulier sera apporté aux animaux porteurs du neuromodulateur. Avant chaque enregistrement, le poids, la surveillance du pelage et une éventuelle déshydratation seront recherchés pour prévenir, anticiper et adapter nos soins, complétés par un traitement si besoin.

**20029** 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 (acide rétinoïque et arsenic), 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 PML, une protéine impliquée dans la régulation de nombreuses voies biologiques. 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 (ensemble des éléments permettant la reconnaissance et la défense de l'organisme contre les agents pathogènes) est nécessaire à l'effet thérapeutique. L'ensemble des résultats nous permettra 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 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 (acide rétinoïque, arsenic), administrés soit par injections intra-péritonéales quotidiennes, 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. Ces animaux seront alors soumis aux mêmes traitements de référence (administration intra-péritonéale et/ou chirurgie pour l'implantation de la capsule médicament). Si nous observons toujours l'éradication de la maladie, cela signifiera que les traitements n'impliquent pas le système immunitaire.

Ce projet de recherche s'inscrit dans le respect de la règle des 3 R (remplacement, réduction, raffinement). Tout d'abord, en ce qui concerne le remplacement, de nombreux travaux ont déjà été conduits sans expérimentation animale mais l'emploi d'un modèle souris est désormais requis, malgré les dommages causés aux animaux, pour mieux comprendre le fonctionnement de la seule thérapie ciblée contre le cancer qui existe à ce jour et pouvoir ainsi l'étendre à d'autres maladies que la LAP. Par ailleurs, afin de respecter le critère de réduction, 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 1768 souris sur les 4 ans que durera le projet (1496 souris pour le premier axe et 136 souris pour le deuxième axe). Dans le même but de réduction, nous prélèverons en fin de protocole les os des jambes ainsi que la rate des animaux. Enfin, nous avons raffiné notre méthodologie pour améliorer le bien-être animal. En effet, 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.

**20030** Les anticorps monoclonaux (AcM) sont des molécules dérivées du système immunitaire qui ont un fort potentiel thérapeutique. Une quarantaine est utilisée pour traiter le cancer et les maladies inflammatoires et plus de 300 sont en cours de test clinique. Ils sont maintenant aussi considérés avec un intérêt grandissant pour traiter les infections virales graves comme celles par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine), Virus de la grippe, Ebola, Zika, .... Cependant, leurs conditions d'utilisation ne sont pas encore optimisées. L'amélioration des thérapies par des AcM est donc un enjeu médical majeur. L'une des découvertes importantes de ces dernières années a été la mise en évidence que le traitement par des AcM des animaux infectés et/ou développant des tumeurs, peut induire une réponse immunitaire protectrice à long-terme, semblable à une vaccination. En d'autres termes, les animaux infectés, ou présentant des tumeurs, et traités par AcM survivent sans signes de maladie grâce à l'induction d'une forte réponse immunitaire efficace dirigée contre le virus et/ou la cellule tumorale. Dans ce cadre, il est maintenant important d'identifier les mécanismes impliqués afin d'optimiser, à terme, l'efficacité thérapeutique des futures thérapies par AcM. Ceci, qui est le but principal de l'ensemble de nos recherches, n'est pas réalisable chez l'Homme. Pour progresser dans cette perspective, les expérimentations animales sont donc indispensables.

Notre projet, qui vise à réaliser une étude des mécanismes impliqués dans l'induction d'une réponse immunitaire protectrice par les AcM, se déroulera sur 2 ans. Il inclura 1 procédure permettant d'étudier le rôle d'un type de cellules du système immunitaire appelées « monocytes ».

Nos études portent sur des modèles animaux (rongeurs) d'infections virales. Les animaux utilisés sont des souris pour lesquelles des données scientifiques de la réponse immunitaire sont bien établies et de nombreux outils sont disponibles pour étudier de façon approfondie la réponse immunitaire, ceci avec un recul statistique. En utilisant ces modèles, nous évaluons les mécanismes d'action des AcM chez des animaux infectés et traités par AcM thérapeutiques. Des études sont bien entendu réalisées en parallèle chez des animaux contrôles qui servent de référence. La compréhension de ces mécanismes permettra le développement de thérapies antivirales et anticancéreuses plus efficaces. Ceci se traduira par un bénéfice direct pour les patients.

Nos travaux combinent différentes approches, ainsi qu'un suivi clinique, afin de bien comprendre à la fois la réponse immunitaire et les mécanismes impliqués dans l'induction d'une immunité protectrice. Cette évaluation *in vivo* est indispensable, car il n'est pas possible d'étudier la propagation virale ni la mise en place d'une réponse immunitaire protectrice dans des expériences *in vitro* (Remplacement).

Le nombre d'animaux prévu est basé sur les recommandations des textes de référence, sur des études préliminaires et sur des contraintes scientifiques. Les effectifs sont fixés à 12 animaux par groupe expérimental. L'effectif de chaque groupe a été calculé pour assurer que les résultats soient statistiquement significatifs tout en limitant le nombre d'animaux utilisés (Réduction).

Il est important de mentionner, que la majorité de nos expériences sera réalisée à des temps précoces après infection et traitement, et donc dans la phase pendant laquelle les animaux ne présentent aucun signe pathologique.

Cependant, une condition expérimentale (suivi de la pathologie à long-terme chez des souris infectées) impliquant 12% des animaux, nécessitera l'établissement d'un point limite spécifique (déjà bien défini) pour éviter la souffrance des animaux lors du développement de la pathologie. Par ailleurs, tous les animaux bénéficieront d'un suivi régulier strict, d'une attention et des soins réguliers pour assurer leur bien-être tout au long des études. Le milieu d'hébergement sera enrichi : carrés de cellulose, copeaux de litière (Raffinement).

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 288 souris sur 2 ans.

**20031** Le lapin est aujourd'hui considéré comme un animal de compagnie à part entière au même titre que les chiens et les chats. Les propriétaires n'hésitent plus à consulter et à solliciter une prise en charge médicale ou chirurgicale complète. Le lapin présente de nombreuses affections digestives pour lesquelles l'endoscopie représenterait un excellent examen complémentaire à visée aussi bien diagnostique que thérapeutique. Cependant cet examen nécessite une diète ; mais le système digestif des lapins est fragile et ne supporte pas le jeun de plus de 24 h. L'étude vise à mettre en place un protocole de diète spécifique chez le lapin en vue d'une endoscopie de l'estomac (gastroscopie). Cette diète reposerait sur l'administration de Lafeber Emeraid Intensive Care Herbivore (produit de réalimentation de soins intensifs sans fibres longues) afin de permettre la réalisation de l'examen tout en préservant les fonctions digestives. Deux groupes seront constitués, le premier avec un protocole de 30 heures (24 heures d'alimentation Emeraid et 6 heures de diète) et le second avec un protocole de 54 heures (46 heures d'alimentation Emeraid et 6 heures de diète) avant la réalisation de la gastroscopie. Nous évaluerons la qualité de l'examen d'une part et la reprise du transit digestif suite à cet examen d'autre part. Six lapins adultes seront utilisés, trois pour le protocole 30 heures et trois pour le protocole 54 heures. Afin de limiter l'utilisation des animaux, si les résultats du groupe diète 30 heures se révèlent satisfaisants, l'évaluation sur le groupe 54 heures ne sera pas réalisée. Dans le cas où de la nourriture persistant dans l'estomac rendrait impossible la gastroscopie chez le premier lapin après 30 heures de diète, les deux autres animaux ne seront pas utilisés pour la manipulation, et seule celle sur les trois animaux après diète de 54 heures serait réalisée. Cette procédure sera suffisante pour déterminer si la gastroscopie est réalisable chez le lapin de compagnie. Il n'existe à ce jour et à notre connaissance aucun modèle inerte pouvant mimer la réalisation d'un examen endoscopique et donc remplacer l'utilisation de lapins vivants (remplacement impossible). Afin de réduire le stress et l'éventuel inconfort, la gastroscopie sera réalisée sous anesthésie générale et des analgésiques opioïdes sont utilisés. Les animaux retrouveront une alimentation normale dès leur réveil complet de l'anesthésie. Les éventuelles conséquences de la diète et / ou de la gastroscopie seront évaluées trois fois par jour via la réalisation d'un examen clinique et tout inconfort, douleur, ou ralentissement de transit seront pris en charge médicalement. La gastroscopie étant une technique d'exploration peu douloureuse, couramment utilisée chez l'homme et les carnivores, très bien tolérée, cette procédure durant moins de 15 minutes et réalisée par des spécialistes, nous n'attendons pas de complication et les animaux pourront être proposés à l'adoption à la fin du protocole.

**20032** Le cerveau est protégé par des barrières physiologiques. Elles limitent le passage de molécules du sang vers les tissus cérébraux, et inversement. Elles rendent difficile l'adressage de biomolécules d'intérêt thérapeutique (protéines tels que des anticorps, peptides) vers le cerveau. Franchir ces barrières permettrait à ces biomolécules d'atteindre leurs cibles et d'offrir aux patients de nouvelles approches thérapeutiques.

Des anticorps de lama, aussi appelés nanobodies, spécifiques des récepteurs du glutamate (un messenger chimique dans le cerveau) ont été produits au laboratoire. Parmi eux, plusieurs ont la capacité d'entrer dans le cerveau et donc de franchir les barrières physiologiques. Le but de notre étude est d'utiliser ces nanobodies comme des cargos pour l'entrée dans le cerveau de biomolécules d'intérêt thérapeutique qui seules ne pénètrent pas dans l'organe. Les objectifs spécifiques de ce projet sont : 1-évaluer l'entrée dans le cerveau de nanobodies d'intérêt thérapeutique ciblant les récepteurs des messagers chimiques glutamate et GABA avant leur

couplage à un nanobody cargo ; 2-évaluer la capacité de ces nanobodies cargos à délivrer une protéine (la protéine fluorescente verte EGFP), un peptide (la neurotensine) et des nanobodies d'intérêt thérapeutique, qui seuls n'arrivent pas à entrer dans le cerveau ; 3- mettre en place une méthode de quantification des nanobodies dans le cerveau et le sang.

Ce projet sera mené conformément à l'application de la règle des 3R :

1. Remplacement : le remplacement de l'animal n'est pas possible pour cette étude. Des collaborateurs ont montré par différentes méthodes que nos nanobodies reconnaissant le récepteur de type X du glutamate (mGluX) peuvent entrer dans le cerveau après une administration périphérique. Le mécanisme de leur entrée est à ce jour inconnu. Des données préliminaires montrent une importante accumulation dans une région où la barrière hémato-encéphalique, qui est la principale barrière s'opposant à la pénétration des molécules dans le cerveau, est modifiée. Nos données *in vitro* montrent que nos nanobodies sont spécifiques et très affins pour leur cible. De ce fait, nous pensons que leur passage emprunte un mécanisme particulier faisant intervenir de manière indispensable leur cible mGluX.

Un modèle isolé de barrière physiologique tels que des modèles *in vitro* de barrière hémato-encéphalique, ne permettent pas de représenter exhaustivement les potentielles voies d'entrée dans l'organe et toute la complexité de ce dernier. De plus, il n'y a aucun modèle de la région particulière qui semble impliquée dans le passage de nanobody. Ainsi, étudier le passage de ces nanobodies *in vitro* ne pourrait apporter de preuves irréfutables confirmant ou infirmant cette propriété de pénétration dans le cerveau. Le recours à l'animal sera inévitable.

2. Réduction : l'étude sera réalisée en 4 étapes sur un total de 2594 souris (1844 souris sauvages et 750 souris déficientes en mGluX appelées mGluX KO). La première étape évaluera la capacité d'un nanobody cargo à délivrer la protéine EGFP. La seconde évaluera tout d'abord l'entrée de nanobodies d'intérêt thérapeutique, chacun reconnaissant un des 8 récepteurs du glutamate et le récepteur du GABA, avant couplage au nanobody cargo ; puis l'efficacité d'un nanobody cargo ciblant mGluX à délivrer dans le cerveau les nanobodies incapables de le faire par eux-mêmes. Huit nanobodies seront testés par cible, soit un total de 72 nanobodies. Nos résultats préliminaires ne permettent pas de prédire leur efficacité d'entrée. De ce fait, il sera difficile de réduire le nombre de nanobodies testés, et par conséquent, le nombre d'animaux utilisés. L'étape 3 s'intéressera à l'entrée de la neurotensine avant et après couplage au nanobody cargo. L'étape 4 servira d'étude pilote pour la mise en place d'une technique de détection/quantification des nanobodies dans le cerveau et le sang.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et en prévention d'une éventuelle sensibilité des femelles à l'hypothermie induite par la neurotensine, seules les souris mâles seront utilisées lors de cette étude. Les effectifs par lot de souris ont été déterminés dans le but d'obtenir des résultats statistiquement valides.

3. Raffinement : cette étude impliquera l'utilisation d'une lignée de souris génétiquement modifiées, déficientes en récepteur mGluX, dont le phénotype n'est pas dommageable. Tous les animaux de cette étude seront placés dans un milieu enrichi, avec un accès à l'eau et à la nourriture ad libitum, sous surveillance régulière. Les données obtenues par nos précédents collaborateurs suite à un traitement aigu avec les nanobodies dirigés contre mGluX ne montrent pas de signe de souffrance supplémentaire à l'introduction de l'aiguille chez l'animal. Cependant, d'après la littérature, la protéine EGFP pourrait présenter une toxicité cellulaire. Quant à la neurotensine, on s'attend à une diminution de la température corporelle. Afin de prévenir la douleur, la souffrance et les dommages chez l'animal, les souris seront rapidement sacrifiées après une injection unique d'EGFP soit 4h post-injection. Les animaux traités à la neurotensine seront immédiatement placés dans une boîte chauffée après l'expérimentation. Une baisse de plus de 3°C accompagnée de signe de détresse conduira immédiatement à l'euthanasie. La dose de neurotensine sera alors réajustée.

Notre étude comporte des procédures nécessitant des prélèvements répétés de sang ainsi que de la chirurgie cutanée pour l'implantation d'un dispositif de mesure de la température corporelle et l'implantation de canules pour des injections en intracérébroventriculaire. Les animaux opérés seront anesthésiés durant toute l'opération, traités avec un analgésique avant et après l'acte

chirurgical et auront une semaine de récupération post-opératoire sous surveillance quotidienne. Les injections en intracérébroventriculaire et intrapéritonéale seront réalisées sur des groupes d'animaux distincts. Les prélèvements sanguins seront espacés d'au minimum 3h. Le volume maximal total de sang prélevé en 24h sera de 1% du volume sanguin circulant de l'animal.

**20033** Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans les pays développés. En dépit de l'amélioration constante de la prise en charge des patients, de nombreux progrès restent à faire et de nombreux travaux sont actuellement menés afin de mettre sur le marché de nouveaux traitements thérapeutiques anti-tumoraux.

Tout nouveau traitement entrant en essai clinique chez l'Homme, doit au préalable avoir démontré son efficacité thérapeutique potentielle lors d'études précliniques. Cette preuve de concept expérimentale permet de mettre en place un rationnel scientifique solide et nécessite des preuves de concept *in vitro* mais également *in vivo*. Cette preuve de concept est basée sur l'utilisation de modèles expérimentaux pertinents et parfaitement maîtrisés. La maîtrise des modèles expérimentaux est un élément clef pour la réalisation d'études reproductibles et respectant au mieux les 3R.

Lorsque qu'un modèle en provenance d'un autre laboratoire est intégré au sein de notre collection, de nombreux facteurs environnementaux peuvent avoir un impact sur ses caractéristiques de croissance et il est essentiel, avant toute première étude de pharmacologie expérimentale, de caractériser à nouveau les paramètres de tumorigénicité et de croissance de chaque modèle à intégrer afin de réduire et raffiner au mieux les études de pharmacologie expérimentale ultérieures.

L'objectif de ce projet est de caractériser *in vivo* les propriétés tumorigènes et les caractéristiques de croissance tumorales de différents modèles de cancers humains dérivés de patients ou de lignées cellulaires.

Concernant la règle des 3Rs,

**Remplacement** : La prise de greffe tumorale implique la formation de nouveaux vaisseaux sanguins pour irriguer la tumeur. Une fois établie, la tumeur en croissance peut interagir avec l'ensemble de l'organisme et avoir un impact sur la souris porteuse, par sécrétion de différents facteurs pouvant notamment induire une cachéxie de l'animal. Ces paramètres ne peuvent pas être observés *in vitro* et le recours à l'animal est donc nécessaire pour ces observations clefs.

**Réduction** : Les modèles qui seront évalués sont tous des modèles pour lesquels nous disposons de données décrivant leur capacité à s'établir et se développer sur Souris. Ces données sont collectées auprès des fournisseurs des modèles et dans la littérature scientifique. Ces données permettent de réduire le projet aux seuls modèles dont la capacité à se développer sur Souris est avérée et de définir un cadre d'observation permettant de réduire le nombre d'animaux utilisé au nombre strictement nécessaire à celle de ces paramètres. De plus, les caractéristiques collectées permettront de significativement réduire le nombre d'animaux utilisé dans les études de pharmacologie expérimentales ultérieures grâce à la meilleure maîtrise de ces variables.

**Raffinement** : Nous utiliserons toutes les données compilées préalablement par les structures ayant développé les modèles objet de ce projet ainsi que celles publiées dans la littérature scientifique lorsqu'elles existent. Ceci permettra de prédéfinir les paramètres critiques connus, les anticiper et minimiser les effets secondaires sur les souris.

Les animaux seront acclimatés au moins 7 jours avant d'être greffés, puis seront greffés sous anesthésie avec un mélange d'anesthésique et de tranquillisant. Outre la surveillance quotidienne post-greffe, les animaux seront observés au moins une fois par jour pendant toute la durée de la procédure expérimentale afin de déceler et notifier rapidement tout signe de changement dans le comportement ou l'état de santé des animaux. En cas de modification du comportement normal ou de l'état de santé des animaux surveillés, des actions visant à prévenir douleur ou angoisse seront appliquées.

Le projet dont la durée est de 5 années sera constitué de 50 études visant à évaluer 50 modèles tumoraux au maximum. Les études comprendront chacune 10 animaux, soit un total de 500 animaux au maximum.

**20034** L'objectif du projet est de développer une approche nouvelle pour la préservation des organes de donneurs grâce à une machine de culture d'organe *ex-vivo*, afin d'établir un modèle *in vivo* de culture d'organes permettant de maintenir des organes viables plus de 4 jours. En effet, à l'heure actuelle il existe un délai maximal de 24h pour pouvoir greffer un rein prélevé chez un donneur décédé, ce qui pose des contraintes logistiques pour la greffe d'organes. La machine de culture consiste en une chambre qui permet la perfusion d'un organe à taille humaine et ainsi l'oxygénation des cellules avec un renouvellement permanent du milieu de culture à température sub-normothermique. Les données préliminaires de reins porcins ou humains mis en culture dans la plateforme confirment qu'après 4 jours de culture, les reins gardent des fonctions cellulaires et un métabolisme énergétique préservés. Après cette analyse *ex-vivo*, l'objectif de ce travail est de réaliser une analyse *in vivo* de la transplantabilité de ces organes dans un modèle porcin, afin d'aboutir rapidement sur un essai clinique.

Dans cette étude, nous ne pouvons pas « Remplacer » l'usage de l'animal car nous évaluons un modèle pré-clinique de la transplantation, uniquement faisable chez le gros animal. Le porc est un modèle de choix, car ses caractéristiques anatomiques rénales sont très proches de l'homme et permettent donc une translation directe. Nous avons réduit au maximum le nombre de porcs et estimons celui-ci à 8 individus. Dans la mesure où c'est une preuve de concept, seuls 4 porcs sont nécessaires pour faire preuve, avec un porc supplémentaire par condition prévu en cas d'aléa non prévisible pour un total de 8. Le « Raffinement » est envisagé en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individus ainsi qu'en étant attentif à leur bien-être, en utilisant des analgésiques, avant, pendant et après toute chirurgie, et à leurs conditions d'hébergement.

Le « Raffinement » est envisagé en réalisant un maximum de tests et de prélèvements tissulaires par individus ainsi qu'en étant attentif à leur bien-être, en utilisant des analgésiques, avant, pendant et après toute chirurgie, et à leurs conditions d'hébergement. La méthodologie expérimentale (nombre d'animaux, nombre de procédures par animal et nombre de tests par animaux) est optimisée afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux. Le modèle animal choisi est le plus pertinent tant au niveau de l'espèce que du protocole. Les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisés et enrichies pour assurer le bien-être des animaux. Les procédures opératoires seront réalisées avec attention quant au respect des conditions anesthésiques et analgésiques, par un personnel entraîné et attentif à l'éthique animale. Des points limites précoces ont été instaurés afin de réduire au maximum le mal-être animal.

**20035** Depuis quelques années, les cliniciens ont observé que les patients ayant reçu des anesthésiques locaux en complément de l'anesthésie générale lors de leur chirurgie pour cancer avaient une meilleure survie et moins de récurrences. Cette observation laisse supposer que les anesthésiques locaux pourraient exercer une action antitumorale. Les premières expériences menées en laboratoire ont permis de mettre en évidence une toxicité directe des anesthésiques locaux sur les cellules cancéreuses médiée par une dysfonction mitochondriale et l'activation d'une mort dite immunogène capable de stimuler le système immunitaire et dont deux marqueurs spécifiques ont été observés (ATP et HMGB1 mais pas la calreticuline). L'objectif de ce projet est de déterminer si ces produits induisent également une dysfonction mitochondriale et une mort immunogène des cellules cancéreuses dans un organisme vivant (= *in vivo*). Seul un modèle vivant nous permettra d'étudier l'activation du système immunitaire, impossible à mettre en évidence avec des expériences *in vitro*. Nous souhaitons également amplifier cette mort immunogène en associant de la calreticuline recombinante et des immunothérapies aux anesthésiques locaux.

Dans ce projet, l'ensemble des expériences a été conçu 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 le nombre total d'animaux sera de 360 souris. Les conditions d'hébergement sont adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau, le milieu est enrichi à l'aide de coton, cage propre, renouvellement de l'air, éclairage contrôlé afin de respecter le cycle physiologique des souris). Les animaux seront observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict (avec échelle d'hétéroévaluation relevant des signes de mal-être tels que: perte de poids, pelade, agressivité, prostration, agitation, petits yeux, oreilles en arrière...) permettra de vérifier l'absence de mal-être. 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.

**20036** Ce document présente la séance de travaux pratiques effectuée sur des grenouilles par des étudiants engagés depuis un an dans une filière scientifique à dominante physiologique. Ce TP de licence SVT (Sciences de la Vie et de la Terre) fait partie de l'unité d'enseignement (UE) "Communication cellulaire". Il permet à des étudiants avertis, formés à la théorie, d'étudier *in vivo* la communication cellulaire et notamment la jonction neuro-musculaire. Au cours de la séance, les étudiants pourront enregistrer *in vivo* les activités nerveuses et musculaires dans différentes conditions expérimentales. L'expérimentation se fait sur le nerf sciatique et le muscle gastrocnémien de la grenouille. Les animaux sont euthanasiés avant l'entraînement des étudiants afin de préserver l'intégrité du matériel biologique, et ce par une personne habilitée à la mise à mort des animaux. Une évaluation des points limites sera suivie avec actions correctives si nécessaires. Aucun traitement analgésique ne sera appliqué car celui-ci ne peut être compatible avec les objectifs du projet. Le projet se compose d'une procédure qui détaille la préparation de l'animal à cette expérimentation. Il s'agit d'une mise à mort dérogatoire qui est la décérébration et démyélinisation par aiguille montée précédées d'une anesthésie au MS222 (0.25 g/L), la méthode d'euthanasie réglementaire au MS222 (3g/L) étant délétère pour les activités nerveuses et musculaires que l'on veut enregistrer. Le nombre d'animaux est réduit au minimum (1 grenouille pour 4 étudiants et par séance, c'est-à-dire un membre postérieur par binôme). Chaque année sont formés au maximum 13 groupes de 16 étudiants, soient 52 grenouilles /an. Le nombre total d'animaux requis pour 5 ans est de 260 grenouilles. Les animaux sont hébergés à plusieurs en aquarium dans les conditions réglementaires et leur bien-être est une priorité (acclimatation, enrichissement par plage et galets pour sortir de l'eau, observation quotidienne au plan clinique).

Pour les enseignements pratiques de la physiologie, la plupart des séances de travaux pratiques se font en simulation dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales. Ainsi la réduction du nombre d'animaux a été rendue possible par l'utilisation de logiciels disponibles portant sur la simulation de l'activité nerveuse. Néanmoins cette méthode alternative ne permet pas d'apprendre aux étudiants la rigueur expérimentale relative au travail sur matériel vivant. L'approche du modèle animal se trouve donc totalement complémentaire de l'acquisition des connaissances théoriques en physiologie animale. La dissection de la préparation dure en moyenne une dizaine de minutes. La préparation biologique est ensuite utilisée tant que les résultats expérimentaux sont cohérents avec les résultats attendus.

**20037** Le syndrome de Meier-Gorlin (MGS) est une maladie rare (1 naissance sur 1000000) caractérisée par un défaut de croissance *in utero* et post-natal aboutissant à une petite taille, de petites oreilles et à de petites rotules ou leur absence. A cette triade clinique s'ajoute un large spectre d'autres anomalies, notamment des défauts du squelette incluant des os longs plus fins, une déformation de

l'articulation du genou ou encore une minéralisation ralentie des os. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1959 mais ce n'est qu'en 2011 qu'en sont identifiées les causes moléculaires, ce qui a permis le diagnostic moléculaire d'une centaine de patients dans le monde, dont 28 en France. Des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus de duplication de l'ADN sont à l'origine de ce syndrome. Parmi ces mutations certaines sont plus fréquentes. Une mutation génétique particulière entraîne un défaut de la minéralisation de l'os chez la souris et des taux anormaux dans le sang de métabolites associés au remodelage de l'os, ce qui reproduit certains signes cliniques observés chez les patients atteints du syndrome. Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre les conséquences phénotypiques de cette mutation dans le modèle *in vivo*, qui récapitule des défauts chez les patients, et plus particulièrement les conséquences au niveau de la composition chimique de l'os, et de la formation et du remodelage de l'os. Dans ce cadre, les objectifs du projet sont de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement et la croissance de l'os et les conséquences biologiques, cellulaires et moléculaires de la mutation en utilisant un modèle murin codant la protéine mutée. Sur une période de 3 ans, 48 animaux seront nécessaires de manière à étudier la biologie de l'os. Pour cela nous utiliserons une technique non invasive, la technique de radiographie, sur des animaux placés sous anesthésie générale.

Ce projet sera mené dans le respect des règles des 3R :

**Réduction** : Toutes les procédures du projet sont réalisées sur les mêmes lots d'animaux et notamment par l'utilisation d'une technique non invasive, la radiographie par Faxitron, sur des animaux placés sous anesthésie générale. A partir d'une première analyse phénotypique, nous avons estimé le nombre optimal d'animaux par lot permettant de réaliser des tests statistiques fiables et obtenir des résultats scientifiques robustes.

**Raffinement** : Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et seront maintenus en groupes sociaux. Le milieu sera enrichi par des tubes de carton. Plusieurs points limites sont mis en place dans le but d'identifier une éventuelle souffrance des animaux et de les euthanasier de manière anticipée si nécessaire.

**Remplacement** : Les modèles cellulaires ne permettent pas de récapituler les processus impliqués dans la morphogenèse osseuse, la chronologie des processus développementaux et les interactions des cellules osseuses avec leur environnement et les autres tissus, ainsi que d'analyser la structure 3D de l'os. Le recours à l'animal est donc nécessaire.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement et la croissance de l'os, et permettra d'apporter un éclairage nouveau sur l'origine des signes cliniques des patients atteints de MGS.

**20038** Les maladies inflammatoires sont actuellement un problème de santé publique majeur et touchent les grands appareils du corps humain comme le système digestif, le système nerveux, l'épiderme, les articulations ... Une inflammation dérégulée (exagérée et/ou irrésolue) peut être à l'origine de multiples pathologies inflammatoires : la maladie de Crohn, la maladie d'Alzheimer, les réactions allergiques ou bien encore les rhumatismes.

Mécanisme normal de défense de l'organisme face à une agression, l'inflammation permet d'apporter immédiatement sur les lieux de la réponse inflammatoire les agents chargés de lutter contre cette agression. Grâce à une réaction en chaîne très efficace et impliquant de multiples acteurs, l'agent déclencheur est éliminé et la réparation du tissu abîmé est entreprise. La mobilisation et l'interaction de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires rend l'exploration de l'ensemble des événements conduisant au développement d'une inflammation impossible par une approche substitutive de culture cellulaire. Les modèles animaux sont donc particulièrement essentiels pour évaluer l'impact de candidats médicaments dans un but thérapeutique.

L'objectif de ce projet est donc d'évaluer de nouveaux candidats médicaments dans le processus inflammatoire à partir d'un modèle murin de poche d'air sous-cutanée.

La poche d'air sous-cutanée est un modèle *in vivo* qui permet d'étudier les composants de l'inflammation aiguë et chronique, la résolution de la réponse inflammatoire, la réponse au stress oxydatif et les cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'inflammation.

L'induction de la pathologie est simulée grâce à l'injection d'un agent inflammatoire (zymosan ou TNFalpha ou thioglycolate ou carraghénine ou cristaux d'acide urique MSU) dans la poche, fournissant ainsi un modèle de la réponse inflammatoire observée chez les patients atteints de maladies inflammatoires. Cette réponse peut facilement être quantifiée, offrant la possibilité d'identifier de nouveaux médicaments anti-inflammatoires.

Le modèle murin de poche d'air sous-cutanée présente des avantages considérables par rapport aux autres modèles inflammatoires. La facilité technique de la procédure, la mesure de plusieurs paramètres (biochimique, cellulaire, histologiques ...) possible sur un même prélèvement par animal (volumes importants d'exsudats inflammatoires collectés) réduisent le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet comportera deux procédures :

La procédure 1 qui nécessitera 36 souris consiste à évaluer l'efficacité de la molécule à tester sur l'intensité d'inflammation aiguë induite par un agent inflammatoire dans le modèle murin de poche d'air sous-cutanée.

La procédure 2 qui nécessitera 96 souris consiste à mesurer la pharmacocinétique du composé à tester.

En fonction de la demande du client, l'inflammation sera induite par un des agents inflammatoires suivants : le zymosan, le TNFalpha, le thioglycolate, la carraghénine ou les cristaux d'acide urique MSU.

Sachant qu'un seul des 5 agents inflammatoires sera choisi par le sponsor, nous utiliserons donc 132 souris par étude (36 dans la procédure 1 + 96 dans la procédure 2). A raison de 2 études par an, cette étude nécessite 264 souris. Soit 1320 animaux pour la totalité du projet.

Dans le respect de la règle des 3R, et lorsque cela est possible, ces candidats médicaments sont évalués sur culture cellulaire ou organe isolé préalablement aux tests animaux afin de remplacer ou de réduire le nombre d'animaux impliqués dans les protocoles. Nous utiliserons le nombre minimum de souris nécessaire à une analyse statistique (t- test, Anova) en prenant en compte la variabilité interindividuelle. D'autre part, un raffinement des protocoles sera effectué en fonction des avancées technologiques dans le domaine. Les animaux seront hébergés selon les conditions de la nouvelle réglementation 2010/63. Leur environnement sera également enrichi d'igloo et de buchettes de bois. Chaque animal entrant dans une étude disposera d'une fiche individuelle de suivi sur laquelle tout traitement et observation seront reportés. Le poids corporel sera mesuré 1x/semaine pour la procédure 1 et tous les jours pour la procédure 2. L'état de santé des animaux sera évalué quotidiennement selon des critères d'apparence physique (perte de poids significative, gêne respiratoire...) et comportementaux (animal prostré, agressivité...) définis en accord avec le comité de suivi du bien-être animal de notre établissement. Une dégradation trop importante de l'état de santé pourra entraîner l'arrêt immédiat de l'expérimentation, par une méthode de mise à mort détaillée dans le paragraphe 3.3.3. Certains critères suffiront à eux seuls à l'arrêt de l'expérience tels qu'une perte de poids trop importante, la suffocation ou le coma de l'animal.

Un traitement pharmacologique (anti-inflammatoire ou analgésique) visant à réduire la souffrance de l'animal ne pourra pas être envisagé sans compromettre les résultats de l'étude. Il est décrit dans la littérature que les morphiniques modifient le système immunitaire. De plus, l'utilisation d'anti-inflammatoire perturberait également la réponse immunitaire alors que cette étude est basée sur l'inflammation.

**20039** Nous avons mis en évidence que des ARNs particuliers (appelés Long non coding RNA: LncRNA) étaient exprimés plus fortement dans les tumeurs mammaires agressives de patientes atteintes de cancer du sein par rapport à des tumeurs moins agressives. Nous avons aussi vu *in vitro* que la perte d'expression de ces LncRNA conduisait à une diminution de la prolifération des cellules tumorales. Nous voulons maintenant déterminer si ces LncRNA ont un effet sur la croissance et le



développement de métastases de cellules tumorales mammaires injectées à des souris soit dans la glande mammaire, soit en intra-veineux. C'est un modèle préclinique essentiel pour comprendre le cancer mammaire et proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

Remplacement : 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 utiliser les animaux nécessaires pour notre étude.

Les souris sont suivies quotidiennement (WE et jours fériés compris) avec fiche de suivi par les zootechniciens et un suivi visuel et par palpation et mesure à pied à coulisse des tumeurs est réalisé. Si le zootechnicien constate l'apparition d'une tumeur approchant les 1.5cm<sup>3</sup>, 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 24h maximums.

96 souris développant des tumeurs seront utilisées sur la durée du projet : 5 ans.

**20040** La protéine kinase CK2 est une enzyme dont la dérégulation dans les processus cancéreux est démontrée. En effet, des niveaux d'expression anormalement élevés de CK2 ont été décrits dans de nombreuses tumeurs solides telles que les cancers du sein, du rein, du poumon et du cortex surrénalien, cancers pour lesquels peu ou pas de traitement efficace existe. Son activité est également corrélée à la progression tumorale. C'est donc une cible thérapeutique de choix pour laquelle un composé inhibiteur le CX-4945 fait l'objet actuellement d'une étude clinique de phase 2. Nous avons développé une nouvelle génération de molécules inhibitrices, plus spécifique de la protéine CK2 est surtout plus active et efficace *in vitro*. Ce sont ces nouvelles molécules que nous souhaitons valider dans différents modèles murins (souris) de tumeurs humaines. Ces modèles sont les plus adaptés pour prédire l'efficacité d'un traitement. De plus, ils se rapprochent au mieux de la biologie de la pathologie humaine et permettent l'identification plus rapide de biomarqueurs prédictifs de la réponse au traitement.

Ce projet s'inscrit dans le besoin de tester de nouvelles molécules prometteuses dans différents modèles tumoraux murins. Les cellules tumorales spécifiques de chaque cancer seront implantées soit dans les organes cibles (en orthotopique) soit en sous-cutané ou dans la circulation sanguine (dans la veine caudale). Le projet visant à développer de nouvelles thérapies pour traiter le cancer, il nous est impossible de remplacer l'organisme vivant intégré (ici la souris) par un modèle cellulaire. Les effets des molécules inhibitrices sur la croissance tumorale et la dissémination de métastases pourront être évalués, ainsi que leur impact au niveau d'un organisme entier. Nous avons retenu un modèle murin, élevé dans des établissements agréés et nous maîtrisons les différents modèles de greffe. Le choix et le nombre de rongeurs ont été déterminés grâce aux expériences réalisées dans le cadre d'un projet antérieur. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés (1000) au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées et d'obtenir des données significatives pour évaluer l'effet thérapeutique des molécules testées. Ce projet sera réalisé dans les cinq ans à venir.

Les expériences seront réalisées dans un laboratoire contrôlé pour l'absence de pathogènes. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'étude et évalué grâce à une grille d'observation clinique permettant de limiter les contraintes pour les animaux. L'utilisation de cette grille nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance des animaux. Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus, pour lesquels il sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou une euthanasie. Les animaux sont hébergés en groupe dans un milieu enrichi de maisonnettes et de carrés de coton ou papier pour faciliter la nidification.

**20041** La mortalité préoccupante de la COVID-19, causée par l'infection au virus SARS-CoV2, est due à un emballement de la réponse immunitaire dirigée contre le virus. Cet emballement conduit à un orage cytokinique, une sur-inflammation induite par une production trop importante de cytokines pro-inflammatoires qui sont des molécules naturellement produites pour favoriser la réponse immunitaire. Cet orage cytokinique touche tous les organes, conduisant à une défaillance multi-organe et au décès des patients les plus fragiles. Aujourd'hui, il n'y a aucune solution thérapeutique pour contrôler cet orage cytokinique et sauver les patients les plus sévèrement touchés. Ainsi, tout agent capable de moduler les phénomènes inflammatoires responsables de cet emballement immunitaire sera un candidat médicament de choix pour le traitement des cas sévères de COVID-19. Dans le cadre de ce projet, nous proposons de tester l'efficacité thérapeutique de molécules anti-inflammatoires innovantes ayant un mécanisme d'action non conventionnel. Ces molécules ciblent les principales cellules immunitaires responsables de l'orage cytokinique et les réduisent pour que le système immunitaire retrouve son équilibre : c'est la résolution de l'inflammation. Parmi les étapes clés du développement d'un nouveau médicament figure l'évaluation de son efficacité thérapeutique (phase préclinique). Cette étape nécessite des analyses rigoureuses sur des cellules en culture (*in vitro*) et chez l'animal (*in vivo*). Nous avons d'ores et déjà réalisé les expériences *in vitro* pour montrer l'activité anti-inflammatoire de nos composés envers plusieurs types de cellules immunitaires, ainsi qu'une efficacité thérapeutique dans plusieurs modèles murins de pathologies inflammatoires (arthrite rhumatoïde, sclérose en plaque, uvéite et psoriasis). Par ailleurs, des études de toxicologie chez le rongeur et chez des primates non humains ont montré que notre molécule candidate principale ne présente pas de toxicité. Désormais, notre objectif est de tester 3 de nos molécules candidates anti-inflammatoires dans trois modèles animaux d'inflammation pulmonaire et d'orage cytokinique. Afin d'optimiser l'étude de l'efficacité thérapeutique de nos molécules, il convient d'évaluer la dose optimale d'utilisation ainsi que la voie d'administration la plus appropriée. C'est pourquoi le recours à 630 animaux en 3 phases d'étude sur 3 ans est nécessaire.

L'étude sera menée en 3 phases, chacune correspondant à un modèle d'inflammation d'intensité grandissante. Si nos molécules montrent une efficacité dans les modèles mimant une pathologie moins sévère, alors son activité sera évaluée dans le modèle d'inflammation plus importante.

Ce projet se base sur des résultats d'expériences réalisées *in vitro* ainsi que plusieurs preuves de concept de l'efficacité du composé dans des modèles murins de maladies inflammatoires. De plus, il s'inscrit dans la logique et le respect de la règle des « 3R » :

**Remplacer** : Le développement d'un nouveau médicament nécessite une phase préclinique, pré requis obligatoire pour la première utilisation chez l'Homme. La COVID-19, et l'orage cytokinique qu'elle peut provoquer, étant des pathologies complexes (action concertée de plusieurs acteurs cellulaires), il est difficilement modélisable *in vitro* ou *ex vivo*. De fait, notre projet nécessite des expériences chez l'animal.

**Réduire** : En fonction des résultats obtenus dans la partie 1, nous pourrions choisir de poursuivre ou non avec la partie 2. Dans le but de définir au mieux le nombre d'animaux à utiliser, nous avons calculé à l'aide d'un test de puissance, le nombre minimal de souris à inclure par groupe (n=10) pour mettre en évidence une différence significative entre les traitements. De plus, l'expérience et le savoir-faire technique que nous avons acquis au cours des précédentes preuves de concept *in vivo* que nous avons réalisées, nous permettent d'optimiser chaque animal en quantifiant de multiples paramètres.

**Raffiner** : 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 d'analgésiques. En outre, les responsables du projet ont été formés à l'utilisation des animaux à des fins scientifiques et garantissent la formation et l'encadrement des autres expérimentateurs impliqués dans les procédures expérimentales.

**20042** La sclérose latérale amyotrophique (SLA), est une maladie neurodégénérative des motoneurones de l'adulte. Elle est caractérisée par une dégénérescence progressive des motoneurones. Elle provoque une paralysie progressive de l'ensemble des muscles. Les lésions nerveuses induisent l'activation d'une réponse compensatoire pour contrecarrer la perte de masse et de fonction musculaires.

Une précédente étude nous a permis de montrer que la protéine GDF5, jouait un rôle très important dans le maintien de la masse musculaire. La protéine GDF5 est essentielle pour éviter une atrophie excessive mais aussi pour favoriser la ré-innervation après l'endommagement des nerfs.

Pour ce nouveau projet, nous émettons l'hypothèse que le GDF5 pourrait avoir un effet bénéfique pour la SLA. Ce projet consistera à évaluer une approche thérapeutique basée sur l'augmentation de l'expression de la protéine GDF5. Les animaux atteints de SLA seront injectés par voie systémique avec une solution permettant la sur-expression de la protéine GDF5. L'objectif de cette étude est d'étudier l'expression du GDF5 dans le muscle et le nerf au cours de la maladie, et d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette protéine GDF5 dans la lutte contre la perte d'activité de fonction liée au muscle et au nerf.

Remplacement: 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. Réduction : Les processus expérimentaux seront conçus de façon à utiliser un nombre de souris limité permettant une analyse statistique. Néanmoins, 8 animaux par groupe seront malgré tout nécessaires, en fonction des procédures, pour permettre une analyse statistique. Dans les tests de survie, d'après la littérature, 26 souris sont nécessaires pour une bonne analyse statistique et une interprétation correcte des résultats. Les protocoles seront rigoureusement élaborés et réfléchis en avance pour que l'expérience soit interprétable et que l'on n'ait pas à la refaire.

Raffinement : 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, un nombre réduit d'animaux par cage (5 maximum hors cages d'accouplement) et pas d'animaux isolés. 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 et de la bouillie pourra être introduite dans les cages si nécessaire. Les animaux seront injectés par voie systémique avec une solution permettant la sur-expression de la protéine GDF5. Pour limiter la souffrance et l'angoisse, les procédures qui le nécessiteront seront réalisées sous anesthésie et sous analgésiques. Au cours des différentes procédures, la température des souris est maintenue constante à l'aide d'une plateforme chauffante ou sous lampe radiante. Les animaux seront ensuite suivis quotidiennement afin de relever le moindre signe de souffrance.

Points limites : Nous décrivons pour chaque espèce et pour chaque procédure, des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur et l'angoisse des animaux.

Le modèle murin que nous envisageons d'utiliser reproduit les principaux symptômes de la SLA et est par conséquent adapté pour évaluer l'efficacité de nos traitements. Ces souris présentent des symptômes à partir de 90 jours (perte de poids) dus à une accumulation de la protéine SOD1

entraînant une paralysie progressive (à partir de 115 jours) et la mort des animaux arrive environ à 140 jours.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons 1768 souris.

**20043** Les anticorps monoclonaux produits sur souris, issues d'élevages agréés, sont utilisés dans des réactifs de diagnostic *in vitro*. Ces réactifs permettent de dépister des maladies infectieuses telles que, le sida, les hépatites, la toxoplasmose ou les méningites bactériennes.

Le principe de détection de ces kits repose sur la réaction spécifique d'antigènes viraux ou bactériens avec ces anticorps monoclonaux.

Sans ces anticorps monoclonaux, les réactifs de diagnostic produits ne seraient pas à la hauteur des performances attendues en termes de qualité et de quantités de tests de dépistage des maladies infectieuses.

Dans le respect de la règle des 3 « R », les actions liées au :

« R » de remplacement :

-Dans les nouveaux produits et les nouvelles versions de produit, les anticorps utilisés sont fabriqués avec des anticorps produits uniquement avec un process « in-vitro ». A titre d'exemple :

(1) Kit HIV (Version 1) : 4 anticorps in-vivo // Kit HIV (Version 2) : 4 anticorps in-vitro

(2) Kit Hépatite : internalisation de la production d'un anticorps qui se fera in-vitro (actuellement production in-vivo par le fournisseur) + passage de la production in-vivo vers une production in-vitro pour 2 anticorps dans le même kit

(3) KIT HIV (autre format) en cours de développement : 2 anticorps produits in-vitro

« R » de réduction :

-L'aspect réduction du nombre d'animaux est traité via une politique de réduction de nos stocks d'anticorps. Une baisse significative du nombre de souris peut être notée dans notre « Demande d'Autorisation à Projet » passant d'une demande de 13000 souris / an (soit 39000 animaux faite en 2018, sur 3 ans) à 7000souris / an pour les 5 ans à venir (soit un total de 35000 animaux). La baisse du nombre d'animaux est donc de 47%.

-Il est à noter que pour les nouveaux kits/produits commercialisés depuis la précédente demande d'autorisation, les anticorps sont produits *in vitro*.

« R » de raffinement :

-Les conditions d'hébergements des souris satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement. Une surveillance quotidienne des animaux est mise en œuvre par un personnel habilité.

-Application dans le plus grand respect de la recommandation (issue de CNREEA et parue le 28juin2017) sur la production d'anticorps par liquide d'ascite chez la souris

Le passage à une production "in-vitro" progresse mais il est toujours nécessaire de produire des anticorps en process "in-vivo" car nous sommes dépendants de certaines conditions :

- Pour certains produits trop anciens, le passage de leurs anticorps en In-vitro est compromise par le manque de matière première biologique permettant de valider ces kits ; Si on change le type de production de l'anticorps, l'enregistrement devient alors irréalisable et par conséquent, le risque est de ne plus fournir un certain nombre de référence-produit destiné au diagnostic de maladies infectieuses (impossibilité pour le médecin d'avoir un diagnostic-patient dû à une rupture produit). C'est le cas par exemple de la trousse de détection du prion bovin pour laquelle il n'existe plus assez d'échantillons positifs pour pouvoir la revalider ce qui entraînerait un arrêt de cette trousse clé pour la détection de la maladie de la vache folle (BSE).

- Difficultés d'enregistrement auprès des instances de certains pays (comme avec la Chine où les délais d'enregistrement sont de 18 à 24 mois minimum, sans pour autant être sûr d'un résultat positif).

=> pour les cas où les productions in-vivo persistent, la réglementation du CNREEA en vigueur (du 28 juin 2017) concernant la production d'Ac monoclonal est strictement appliquée.

**20044** Les anticorps polyclonaux de lapins sont utilisés pour produire des kits de diagnostic servant principalement pour le dépistage de maladies bactériennes (pour exemple : les salmonelloses).

Le principe de détection repose sur la réaction spécifique des antigènes de bactéries avec les anticorps issus de l'immunisation.

Pour obtenir ces anticorps polyclonaux, une suspension antigénique inactive est injectée aux lapins afin de solliciter leur système immunitaire complet pour la production d'anticorps (principe de la vaccination).

La complexité de solutions d'anticorps polyclonaux ne permet pas aujourd'hui d'obtenir des résultats équivalents en affinité, sensibilité et spécificité et influent donc de façon importante de la qualité des produits demandée par les clients.

Le protocole est utilisé pour fabriquer plus de 200 types d'anticorps polyclonaux. Le choix du modèle animal lagomorphe est motivé par des besoins en volume sanguin suffisant (l'utilisation d'animaux plus petits aboutirait au sacrifice d'un plus grand nombre d'animaux et inversement, l'utilisation d'animaux plus grands engendrerait une surcapacité de production).

Dans le respect de la règle des 3 « R », les actions liées au :

« R » de remplacement :

-Aucun modèle alternatif à cette production d'anticorps polyclonaux n'a pu aboutir à ce jour (par nécessité d'avoir un système immunitaire complet) - principe de la vaccination.

« R » de réduction :

-L'aspect réduction du nombre d'animaux est traité via une politique de réduction de nos stocks de sérums de lapins nécessitant de ce fait moins d'animaux (néanmoins 1750 lapins seront utilisés dans les 5 prochaines années)

« R » de raffinement :

- Les conditions d'hébergement des lapins satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement (Cage avec plateforme, bout de bois à ronger, ...).

- Une observation des animaux est réalisée quotidiennement afin de déceler des signes avant-coureur d'un état de souffrance (les signes recherchés sont : comportement agressif / amorphe/ grinçage de dent /etc..). Si tel est le cas, le protocole est arrêté.

- Par rapport au protocole précédemment accepté, une valence analgésique (Buprénorphine) est ajoutée préalablement au sédatif (imalgène) afin de réduire la sévérité de cette partie de protocole.

**20045** Le parasite utilisé dans le protocole est responsable d'une maladie dont la détection est obligatoire chez la femme enceinte. Afin de produire les réactifs de diagnostic nécessaires à ce dépistage, ce parasite est produit pour en extraire ses antigènes de surface. Le maintien en vie de ce parasite nécessite obligatoirement un passage *in vivo* qui, dans ce cas précis, se fait sur la souris.

Dans le respect de la règle des 3 « R », les actions liées au :

« R » de remplacement et réduction :

- Il est a noté qu'une optimisation du protocole a été effectuée en ne gardant que la partie « boost » de la production du parasite. Ceci est venu se traduire par un remplacement partiel du protocole « in-vivo » (reste de la production est réalisé *in vitro*) et par conséquent, la réduction du nombre d'animaux utilisés annuellement (environ 2500 animaux prévus sur 5 ans soit 500souris/an).

« R » de raffinement :

- Les conditions d'hébergements des souris satisfont au principe de raffinement avec l'utilisation de cages adaptées avec un enrichissement de leur environnement. Une surveillance quotidienne des animaux est mise en œuvre par un personnel habilité.
- Il s'agit d'un protocole modéré n'induisant aucune modification de la physiologie animale (procédure courte, pas de production d'ascite, récolte post mortem).

**20046** Les nerfs périphériques, structures chargées de véhiculer l'information douloureuse, peuvent être lésés à la suite d'une maladie ou d'un traumatisme, qu'il soit accidentel (ex : accident de la voie publique) ou suite à un geste chirurgical. Lorsqu'un nerf est lésé, il va véhiculer une douleur atypique, souvent résistante aux antalgiques habituels, appelée « douleur neuropathique », dont le caractère persistant sur plusieurs mois voire plusieurs années est très invalidant pour le patient qui en souffre.

Au niveau de la face, la sensibilité et la douleur sont détectées par les trois branches du nerf trijumeau, chaque branche étant grossièrement responsable d'un tiers de la face (tiers supérieur, tiers moyen et tiers inférieur). Lorsqu'une branche est lésée, comme précédemment mentionné, une douleur importante va être ressentie au niveau de la face, malgré la prise de nombreux traitements différents, altérant profondément la qualité de vie du patient, surtout lorsque celle-ci fait suite à un acte chirurgical « de routine », pourtant bien conduit. Trouver de nouvelles solutions thérapeutiques est donc un objectif majeur de la recherche en douleur et ceci passe par une amélioration de la compréhension des mécanismes de ces douleurs chroniques résistantes.

Ce projet a pour objectif d'étudier les changements apparaissant au niveau des différentes branches du nerf trijumeau (ainsi qu'au niveau du ganglion trigéminal, la zone de convergence des trois branches) lorsque celui-ci est lésé de façon précise et contrôlée dans un modèle animal de douleur neuropathique. La douleur (et en particulier la douleur neuropathique) étant une expérience sensorielle (et émotionnelle) extrêmement complexe, il n'est malheureusement pas possible d'étudier celle-ci et ses mécanismes précis dans des modèles *in vitro* (sur des cultures cellulaires par exemple).

Ce programme nécessite l'utilisation de 320 souris mâles adultes C57BL6/J. Les animaux impliqués dans cette étude seront examinés bi-quotidiennement par les expérimentateurs. Les animaux disposent d'un enrichissement dans leur cage (bâton à ronger et maison en carton). Enfin, le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ».

(Remplacer) Il n'existe aucune méthode alternative (*in vitro*) pouvant répondre aux mêmes questions sans recourir à des animaux vivants.

(Réduire) Le nombre de souris a été réduit au minimum requis pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé

(Raffiner) Les animaux sont examinés quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié. Les souris sont hébergées dans les conditions conformes à la réglementation (bâton à ronger, maisonnette en carton), accès à la nourriture et eau à volonté. De plus, afin d'éviter toute souffrance animale, les animaux bénéficieront d'une anesthésie générale et/ou locale selon les procédures. Des points limites sont définis pour éviter et limiter toute douleur ou souffrance inutile.

**20047** L'aérosolthérapie est une technique de soin consistant à administrer des médicaments sous forme d'aérosol directement dans les voies respiratoires du patient. Cette technique est utilisée majoritairement dans le cadre de maladies pulmonaires. En permettant un ciblage direct et rapide de l'organe malade et en limitant la diffusion du médicament au reste de l'organisme, cette voie permet d'améliorer l'index thérapeutique de nombreux médicaments.

Lors du développement de nouveaux médicaments / molécules aérosolisées, des modèles animaux sont classiquement utilisés pour étudier leur pharmacologie et leur toxicité. Le modèle murin est

largement utilisé dans ce contexte et il existe différentes techniques d'administration chez ce modèle pour permettre le dépôt pulmonaire du médicament (aérosolisation, instillation nasale, instillation orotrachéale, etc.). A notre connaissance, il n'y a peu voire pas de données combinant l'analyse de la quantification de la dose réellement administrée dans le poumon et de la répartition du médicament au sein des voies respiratoires.

Dans le cadre de ce projet, nous proposons d'évaluer et comparer le dépôt de molécules dans le poumon après administration selon 5 techniques différentes chez deux modèles murins très répandus dans des études portant sur les pathologies respiratoires ayant des différences morphologiques au niveau du tractus respiratoire (souche C57BL/6jRj et souche Balb/c).

Plus précisément, nous proposons de mesurer la quantité de molécules déposées et de déterminer leur répartition dans les poumons de ces deux souches de souris à l'aide de deux méthodes d'imagerie complémentaires : imagerie scintigraphique et microscopie à feuilles de lumière (MFL).

Nous apporterons ainsi des éléments scientifiques concrets permettant de mieux considérer/apprécier la technique la plus adaptée en fonction du cahier des charges techniques et des différences morphologiques du modèle murin. Pour cela, nous proposons d'utiliser au total un maximum de 62 souris de souche C57BL/6jRj + 62 souris de souche Balb/c.

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

**Raffiner** : la réalisation des expériences *in vivo* se déroule après une phase d'évaluation *in vitro* de la validation du radiotracteur. Les administrations *in vivo* seront réalisées sous anesthésie. Les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (sous la forme de papier, de fragments de boîte à œuf ou de tunnels en PVC). L'ensemble des procédures sera réalisée de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie...).

**Remplacer** : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité d'un organisme entier et vivant. De plus, ce projet vise à comparer différentes techniques d'administration de molécules à visée pulmonaire et ces techniques sont couramment utilisées dans des études expérimentales chez l'animal.

**Réduire** : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour réduire le nombre d'animaux. Le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux.

**20048** La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation des articulations, qui évolue par poussées espacées par des périodes de rémission, et aboutissant en quelques années à une invalidité aux conséquences socio-économiques lourdes. En l'absence de traitement permettant d'obtenir une rémission complète et définitive dans la PR, il est nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques. Notre équipe de recherche développe depuis plus de 20 ans de nouvelles approches d'immunothérapies pour cibler les cellules pathogènes de cette maladie. Nous testons actuellement une nouvelle approche thérapeutique, *in vitro*, ciblant ces cellules productrices d'anticorps pathogènes bien connus. Nous devons valider ces nouvelles approches thérapeutiques, *in vivo*, dans un modèle expérimental qui mime la pathologie humaine afin de proposer une thérapie chez l'homme. Pour cette validation pré-clinique, nous utiliserons des souris immunodéficientes (ID) qui permettent l'injection et/ou l'implantation de cellules humaines. Le nombre total d'animaux est de 504 souris ID qui seront injectées en intrapéritonéal (i.p.) avec les cellules cibles et les molécules à tester. La douleur induite chez l'animal sera légère, sans phénotype dommageable attendu, correspondant à une simple injection intrapéritonéale et le bénéfice sera grand puisqu'il permettra de valider une approche thérapeutique pour l'homme.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- **Remplacement** : Les stratégies utilisées dans ce projet ont été validées *in vitro* dans un premier temps afin d'optimiser chacun des paramètres et seules les stratégies efficaces *in vitro* seront testées pour une preuve de concept *in vivo* pour une application thérapeutique chez l'homme.

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé à l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer. Seules les molécules efficaces *in vitro* seront testées dans le modèle expérimental.

- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance et le stress des animaux. Les animaux ID seront observés quotidiennement par les zootechniciens pour rechercher tout signe de douleur et de stress. Dès l'apparition d'un signe de souffrance, les investigateurs procéderont à l'évaluation de la souffrance par une grille de score qui prend en compte de nombreux paramètres comportementaux et la perte de poids des souris. Un enrichissement des cages sera réalisé en utilisant des copeaux de litière et des igloos. Les animaux ne seront gardés que quelques heures après l'injection.

**20049** Depuis plus de 30 ans, la population d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) enregistre un déclin et en 2007, l'espèce a été classée en danger critique d'extinction par l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature. Au niveau des côtes européennes, les civelles d'anguille remontent les estuaires pour rejoindre les zones de croissance en eau douce bien que certains individus s'installent en estuaire. La majorité des civelles jeûnent durant leur séjour dans l'estuaire et à nos latitudes, la reprise alimentaire a lieu quand la température de l'eau atteint les 10 à 12°C. Cette phase de reprise alimentaire est cruciale pour la jeune anguille qui remonte les cours d'eau mais également pour celle qui s'installe en estuaire et doit optimiser sa croissance.

Lors de leur traversée de l'estuaire, les civelles d'anguille sont exposées à des cocktails de molécules, en particulier quand elles passent à proximité d'effluents de station d'épuration (STEP), dont les effets sur le métabolisme et le comportement ne sont pas connus. Dans ce projet, nous nous intéressons en particulier à un cocktail de deux molécules (Diazepam et Irbesartan) identifiées dans des effluents de STEP et sélectionnées pour leur potentielle toxicité (rapport entre la concentration de la molécule dans les effluents et la concentration maximale prédite sans effet sur l'environnement). Le diazepam a également la particularité d'être un anxiolytique et un stimulateur de l'appétit qui pourrait affecter le comportement des civelles.

L'objectif de ce projet sera de déterminer l'effet de ces molécules à des doses environnementales, seules ou en mélange, sur les interactions sociales et le comportement alimentaire des individus. Une analyse des contaminants et des composés issus de la transformation biochimique de molécules par le métabolisme (métabolome) sera également effectuée chez les civelles après exposition et récupération dans de l'eau non contaminée.

Pour réaliser cette expérience, 200 civelles au total seront marquées à l'aide d'implants élastomères colorés afin de les suivre individuellement (marques d'environ 1 mm). Le marquage s'effectue après anesthésie et consiste à injecter l'élastomère sous la peau de la civelle à l'aide d'une très fine aiguille. La technique prend quelques secondes par individu et après 15 ans de marquage, aucune mortalité n'a à ce jour été observée au laboratoire suite à cette procédure. Trois lots de 50 civelles seront exposés de façon chronique durant 7 jours à 3microg/L de diazepam, 3microg/L d'Irbesartan et un mélange des deux composés. Les concentrations utilisées correspondent à celles trouvées dans des effluents de STEP. Un quatrième lot de 50 civelles sera exposé à de l'eau de ville déchlorée.

Après les 7 jours d'exposition, 8 civelles de chaque lot seront euthanasiées, pesées, mesurées et conservées à -20°C jusqu'à analyse des contaminants et du métabolome.

32 individus de chaque lot seront également placés par groupe de 8 dans 4 aquariums (32 individus par traitement). Les relations sociales (interactions, agressivité) et le comportement alimentaire (prise alimentaire, interactions avec les congénères durant l'alimentation) seront analysés durant deux semaines. Les civelles en fin d'expérience seront euthanasiées et conservées à -20°C jusqu'à analyse des contaminants et du métabolome. Comportement et résultats des analyses seront ensuite mis en relation.



Après les 7 jours d'exposition, les 10 civelles restantes dans chaque lot seront exposées à de l'eau non contaminée durant une semaine (phase de dépuración). Elles seront ensuite euthanasiées, pesées, mesurées et conservées à -20°C. 8 d'entre elles serviront à l'analyse des contaminants et du métabolome afin de voir l'évolution de ces paramètres une fois l'animal retourné dans un milieu non contaminé. Les deux individus restants par lot serviront au remplacement éventuel en cas de mort d'un individu et à la mise au point des analyses du métabolome. L'analyse métabolomique nécessite en effet plusieurs étapes de préparation des échantillons qu'il faut souvent adapter à l'échantillon et à l'espèce. Des mises au point sont alors nécessaires sur quelques individus avant analyse finale.

De par la particularité du cycle de vie et de la migration estuarienne de l'anguille européenne, l'utilisation pour cette étude d'une autre espèce de poisson est impossible. Deux cents individus seront utilisés, soit environ 60 g. Ce nombre a été fixé en fonction des besoins de matière pour les analyses et du nombre d'individus par aquarium nécessaire pour les interactions sociales. La pêche sera effectuée manuellement à l'aide d'un tamis, technique moins traumatisante que le tamis poussé par un bateau, utilisé par la pêche professionnelle. Par ailleurs, notre expertise en physiologie et comportement de la civelle d'anguille (plus de 25 ans d'étude sur ce modèle), nos installations expérimentales dédiées à l'étude du comportement des poissons, des conditions d'exposition aux contaminants incluant un enrichissement des bacs avec des abris (plantes artificielles, caches), des mesures de température et observations quotidiennes ainsi qu'une collaboration avec des collègues écotoxicologistes et chimistes de l'environnement contribueront à mettre en place des conditions optimales pour les animaux et pour mener à bien les analyses.

**20050** Le diabète de type I et le syndrome de Sjögren sont toutes deux des maladies auto-immunes entraînant la destruction de l'organe cible et sa dysfonction. Le diabète de type I, ou diabète insulino-dépendant, touche plus souvent l'enfant ou le jeune adulte et survient lorsque des lymphocytes T auto-réactifs entraînent la destruction des îlots de Langerhans et par conséquent réduisent la sécrétion d'insuline (hormone indispensable pour assimiler le glucose). Il correspond à une élévation prolongée du taux de glucose dans le sang (=hyperglycémie). Les symptômes les plus fréquents sont une augmentation du volume urinaire, une sensation de soif anormale, une fatigue intense, des douleurs abdominales et des infections fréquentes. L'insulinothérapie est aujourd'hui le traitement le plus courant chez ces patients. Elle permet d'apporter de l'insuline exogène et donc de réguler la glycémie des patients. Cependant, ces traitements sont lourds, à vie et ne permettent pas de restaurer ou protéger la destruction du pancréas par les lymphocytes T auto-réactifs. En parallèle, le syndrome de Sjögren est caractérisé par une infiltration d'auto-anticorps dans les glandes salivaires et lacrymales responsables d'une sécheresse buccale et oculaire. Elle représente 50 à 200000 malades en France et se situe au second rang des maladies auto-immunes. Les traitements actuels visent principalement à diminuer cette sécheresse par du collyre, des larmes artificielles ou de la pilocarpine sans, pour autant, empêcher la destruction de ces glandes. Ces pathologies restent donc incurables et c'est pourquoi de nouvelles stratégies doivent être mises en place. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que les cellules du système immunitaire sont une cible prometteuse dans les maladies auto-immunes. 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 inné 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 jouant 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 utilisé sera de 640 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique.

Le projet a été pensé pour répondre à des besoins scientifiques tout en adoptant un comportement responsable en matière d'expérimentation animale (Règle des 3R). Le nombre d'animaux est réduit par une mutualisation des groupes contrôles lorsque c'est possible, et il est limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le paragraphe ci-dessus présenté est une estimation haute qui sera potentiellement réduit en fonction effets thérapeutiques obtenus. Pour le « Remplacement », ces traitements à évaluer ont déjà démontrés des résultats prometteurs *in vitro* sur de nombreux tests comme des évaluations à partir de PBMC humain frais ou de patients. Les modèles inflammatoires chez la souris nous permettent de valider l'effet thérapeutique de nos traitements à l'échelle d'un organisme ainsi que d'évaluer leur potentiel effet toxique avant d'envisager un essai clinique. Pour le « raffinement » et le bien-être des animaux, une étape d'acclimatation de 5 jours minimum sera respectée avant inclusion dans des protocoles expérimentaux. 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.

**20051** La chlordécone, pesticide rémanent utilisé pour lutter contre des insectes ravageant les bananiers, pollue les sols, les écosystèmes antillais depuis plusieurs dizaines d'années. L'étude Kannari menée conjointement par Sante Publique France et l'ANSE a démontré que 90% de la population antillaise était imprégnée. La voie principale d'exposition est l'alimentation, sachant que les produits animaux sont des contributeurs importants chez les sous-groupes surexposés.

Or il semblerait que certaines conditions de cuisson de la viande permettent de réduire soit la quantité de chlordécone présentée dans les denrées animales telles que consommées, soit sa biodisponibilité, ce qui réduirait alors d'autant l'exposition du consommateur. Afin de tester et d'optimiser les procédés de cuisson (température, pression, mode d'énergie délivrée...), il est nécessaire de disposer de matrices contaminées à des doses compatibles aux techniques analytiques développées. Ceci permettra la détection et l'identification de la molécule mère comme des métabolites générés, tout comme une quantité de matrices suffisante pour réaliser plusieurs préparations. Un effet de l'organe biologique prélevé est attendu (foie versus rein versus différents muscles suivant leur type oxydatif). C'est donc dans l'objectif de pouvoir disposer de matrices issues d'un même animal, contaminées à des niveaux suffisants que le protocole sera mis en oeuvre. Ce dernier consiste en l'exposition répétée de deux jeunes porcs de 30+/-5kg à la chlordécone à des niveaux reconnus pour ne pas engendrer d'effet délétère sur ces individus. Du fait de l'interaction spécifique de la chlordécone avec les tissus biologiques et de la question scientifique, il ne peut être réalisé une contamination *ex vivo* extemporanée de ces matrices par de la chlordécone (pas de métabolisation et interaction non physiologique de la chlordécone au sein des tissus). Afin de réaliser de premiers tests, 2 porcs de 30 kg seront nourris oralement via des boulettes alimentaires contaminés. Après une période d'adaptation de 10 jours, l'exposition sera réalisée pendant 14 jours. Les animaux seront hébergés à deux. La seule procédure expérimentale couvrira donc : 1) la mise en cage individuelle pendant l'exposition de ces porcs de 30kg pendant une période de 1 à 3h durant la période de nourrissage 2) l'exposition orale de ces porcs à des doses non connues pour engendrer des effets délétères sur cette espèce. Dans une logique de réduction du nombre d'animaux, cette expérimentation s'appuie sur les premières données ayant souligné l'importance d'optimiser les étapes de cuisson. L'exposition des animaux a été réfléchi de telle sorte à limiter au maximum le temps expérimental en réalisant une exposition de charge puis d'entretien. Cette

stratégie est la résultante de modèles toxicocinétiques précédemment validés et développés par notre unité. Enfin, des jeux (cordes) seront déposés dans les compartiments d'hébergement afin d'assurer le raffinement de cette expérimentation. Les points limites employés (perte de poids massive (-15%) serait observée sur 3 jours) et une évaluation quotidienne de la douleur au cours de l'expérimentation permettront d'assurer la prise en charge précoce de toute douleur, même si aucun effet douloureux n'est attendu de cette expérimentation.

**20052** 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 malades : 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 (« lead ») : ce lead consiste en fait en un mélange de deux molécules, dont l'une est utilisée comme traitement de référence pour ces maladies. D'une part, le projet a permis de mettre au point une formule compatible avec les deux molécules ; d'autre part, le projet a exploré la possibilité d'injecter les deux molécules séparément. Les résultats de ces projets nous indiquent qu'il est préférable de mélanger les produits. Dès lors, nous souhaitons au cours de ce projet-ci vérifier la stabilité du mélange, au cours des quelques heures qui séparent sa préparation de son injection (« in-use stability »).

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 cette étude pilote le test du « Digit Abduction Score » (DAS), un test reconnu comme pertinent pour mesurer l'activité myorelaxante d'un produit.

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 utiliserons donc le nombre minimal d'animaux par groupe permettant d'arriver à une conclusion.

Concernant le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 avec enrichissement du milieu, et surveillés quotidiennement. Nos études précédentes nous ont permis un raffinement du modèle DAS chez le rat : l'injection intramusculaire dans le membre inférieur est réalisée sous contention par un expérimentateur entraîné, et les mesures de DAS sont brèves, indolores et peu stressantes pour les animaux. Au cours de cette étude, nous souhaitons continuer à limiter au maximum le stress des animaux.

En conclusion, cette étude nous permettra donc de valider un point essentiel pour le développement de notre produit, sa stabilité avant injection. Pour cela, 540 rats au maximum seront utilisés (souche : Sprague-Dawley femelles). Ces données serviront de base à la conception d'essai clinique chez l'homme.

**20053** Les cellules immunitaires sont présentes dans la plupart des 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 essentielle à la différenciation des cellules immunitaires semblables à celles des mammifères. Nous avons obtenu des résultats intéressants 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 la fonction de ces cellules immunitaires au sein du métabolisme des mammifères. En effet, nous avons observé chez nos animaux mutants dans lesquelles cette protéine est absente dans les cellules immunitaires, une prise de poids plus importantes à comparer aux animaux contrôles et cela à 2 reprises.

Pour accentuer cette prise de poids et bien comprendre la fonction de cette protéine, nous allons comparer 10 groupes expérimentaux soumis soit à un régime riche en gras pour induire une obésité soit ou à un régime normal. Les animaux seront pesés une fois par semaine, ce paramètre sera analysé avec des outils statistique pour comparer les groupes. Le suivi du diabète se fera grâce à des prises de sang et à la mesure du taux des lipides et la glycémie.

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 le diabète, l'obésité.

L'ensemble du projet devrait nécessiter 125 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 générer des données statistiques solides.

2) Raffinement : les animaux ont une surveillance quotidiennement ainsi que leurs conditions de maintien (température, humidité) en portoir ventilé conforme aux normes européennes. Des matériaux pour la nidification est mis à disposition pourvoyant ainsi à l'enrichissement du milieu et à l'épanouissement des animaux.

Le recours aux analgésiques et anesthésiques sera systématique pour éviter toute souffrance ou douleur chez l'animal. Les procédures sont exécutées de façon à réduire l'inconfort des animaux, le protocole est court (3mois)

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.

**20054** Parmi les moyens à disposition pour déterminer de nouvelles approches thérapeutiques ou causes de pathologies chez l'Homme, les études d'associations à grande échelle du génome sont largement répandues.

Elles visent à déterminer les génomes d'une cohorte de volontaires et à suivre l'évolution de leur santé durant toute leur vie. L'apparition de maladies est ensuite analysée selon les gènes présents dans leur code génétique.

Les résultats obtenus dans ce type d'étude permettent de mettre en évidence des mutations de certains gènes susceptibles de déclencher des pathologies au cours de la vie.

Parmi les mutations identifiées dans une étude se focalisant sur la maladie d'Alzheimer, nous souhaitons en étudier plus particulièrement une dans un modèle animal.

La première étape a consisté à reproduire la même mutation génétique dans un modèle dont nous pourrions ensuite étudier le comportement/

Nous disposons désormais d'une lignée de rat porteur de cette mutation, et nous souhaitons dans ce projet déterminer si les troubles cognitifs relevés chez les patients porteurs de cette mutation sont aussi présents.

Pour cela, nous disposons de plusieurs tests ciblant les capacités cognitives ainsi que la mémoire à long terme, ces deux aspects sont altérés chez les patients atteints par cette maladie.

Par ailleurs, la mutation peut être portée par un seul ou par les deux chromosomes.

Nous souhaitons donc employer 30 rats (10 animaux contrôles, 10 animaux portant une seule copie de la mutation et 10 animaux porteurs de deux copies).

Ce projet respectera les critères éthiques, notamment la règle d'évaluation des 3R :

- REMPLACEMENT : nous ne disposons d'aucun autre modèle non animal pour évaluer des comportements complexes tels que la mémoire

- REDUCTION : l'effectif de dix animaux par groupe constitue le meilleur compromis entre réduction des effectifs et puissance d'analyse, tel que mis en évidence par des analyses de puissance sur les données générées dans notre laboratoire

- RAFFINEMENT : les animaux seront maintenus dans des conditions optimales d'hébergement avec enrichissement, nourriture et eau à volonté. Ils seront surveillés quotidiennement. Par ailleurs, durant le test nécessitant l'utilisation d'une piscine, ils seront réchauffés et séchés à l'aide d'une lampe et de papier absorbant pour éviter une hypothermie. Des points limites adaptés et des critères d'arrêt ont été prévus pour éviter toute souffrance

**20055** Le végétal occupe depuis très récemment une place, dans le concept One Health, en tant qu'acteur ou pourvoyeur de solutions pour la santé humaine et animale.

Chez le rat, il a été montré que la pomme limiterait l'absorption intestinale des glucides et aurait une action bénéfique sur le métabolisme des lipides d'animaux obèses. Le potentiel des extraits de pommes reste peu exploré chez les carnivores domestiques.

L'objectif de l'étude est de montrer que les chats consomment, sans distinction, leur ration de croquettes avec ou sans l'extrait de pommes et que ce dernier, à la dose choisie, n'a aucune influence sur les paramètres hématologiques et biochimiques de santé globale.

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 les anomalies métaboliques (i.e. diabète sucré) associées au surpoids chez le chat.

Les chats recevront individuellement, chaque matin, durant 4 semaines, leur ration quotidienne à laquelle sera ajoutée de l'extrait de pomme à une dose dix fois inférieure à la dose sans effet observable connue chez le rat soit 130 mg/kg.

Une prise de sang sera réalisée au début et à la fin de la période de supplémentation. Le poids des animaux sera évalué chaque semaine et la consommation notée quotidiennement.

Pour poursuivre cet objectif, nous sommes susceptibles de mettre en oeuvre les procédures suivantes qui concerneront 8 à 10 chats : administration de l'extrait de pommes avec un suivi journalier de la consommation alimentaire et analyses sanguines (biochimie et numération formule). 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.

**20056** Depuis toujours l'homme a observé les animaux car sa survie dépendait de la connaissance de leur comportement. La meilleure connaissance du comportement animal permet de limiter les dégâts involontaires causés aux espèces et la perte de temps et d'argent dues à la mise en œuvre de plans de conservation mal adaptés. Notre projet se propose d'étudier les mécanismes par lesquels des signaux et des indices parviennent à un individu receveur et en modifient le comportement. Les signaux, eux, proviennent d'autres individus et interviennent dans la communication (par exemple acoustique ou olfactive), notamment dans la formation des couples (sélection sexuelle). Les indices, quant à eux, proviennent de l'environnement et interviennent dans la perception du milieu et sont notamment impliqués dans la navigation et le mouvement des individus dans l'espace. Ces signaux et indices pourraient être involontairement changés ou brouillés à cause des actions de l'homme par le biais de modifications environnementales allant des changements climatiques à l'introduction d'organismes exogènes. Un changement de régime alimentaire dû à la diminution/disparition d'une proie peut modifier la couleur des plumes d'un oiseau ou sa capacité à repérer correctement sa nourriture ; un changement de température peut modifier la transmission des chants ou des odeurs ; une modification climatique peut modifier le paysage en changeant ainsi les repères utilisés dans l'orientation. Mieux comprendre comment les animaux utilisent les indices extérieurs et comment ces indices influencent leurs capacités de survie est donc capital pour entreprendre des actions vouées à la préservation des espèces et donc de la biodiversité.

L'originalité de ce projet réside dans le fait que les différentes modalités sensorielles (olfaction, audition, vision), impliquées dans la perception des signaux et indices externes, seront abordées séparément mais aussi en synergie. Les modèles biologiques concernés par notre projet sont essentiellement les oiseaux marins subantarctiques. Ce volet concerne les travaux prévus chez les manchots, les volets concernant d'autres espèces seront présentés sous forme de demandes séparées. Pour ce qui concerne le remplacement, s'agissant d'études comportementales sur la faune sauvage évoluant dans leur milieu naturel, il n'est pas possible de passer à des modèles *in vitro* ou *in silico*. Les exigences de réduction sont aussi prises en compte et le nombre total de manchots utilisés sur la durée du projet est réduit au minimum permettant une analyse statistique fiable. Pendant les 4 ans du projet, 2100 oiseaux seront soumis à des actes identifiés comme « expérimentation animale ». Les exigences de raffinement ont été prises en compte, en adaptant les

dispositifs expérimentaux à la morphologie et au comportement de l'espèce pour assurer un confort aux oiseaux au cours de l'étude. Nos études visent à obtenir des réponses comportementales naturelles, autrement dit, non biaisées par le stress ou la manipulation. Par conséquent, la manipulation de tous les sujets est rapide et l'expérimentation a été construite de manière à pouvoir l'arrêter à tout moment en cas de signes de stress, et pour que l'animal relâché dans son nid souterrain soit dans un état qu'on pourrait définir comme « normal », c'est-à-dire comme s'il n'avait pas été manipulé.

**20057** 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 myopathie caractérisée par une faiblesse et des douleurs musculaires, des variations génétiques sur un gène potentiellement impliqués dans cette maladie et nous souhaitons poursuivre la caractérisation de ce gène sur un modèle animal. En effet, mimer fidèlement ces mutations génétiques humaines sur un modèle animal permettrait de caractériser au mieux cette pathologie et d'apporter une thérapie adaptée.

L'utilisation de souris est indispensable pour valider l'impact des mutations et comprendre la physiopathologie *in vivo*. Ainsi, les modifications génétiques chez l'animal nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris et de mieux comprendre leur développement (REPLACEMENT).

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 12 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, l'évaluation de 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 pour éviter toutes souffrances (RAFFINEMENT).

Pour cette étude, 58 souris seront nécessaires.

**20058** But du projet: L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un enjeu majeur de santé publique. La majorité des AVC consécutifs à l'obstruction d'une artère cérébrale par un caillot représente la première cause d'invalidité acquise non traumatique, et la deuxième cause de décès (première cause de décès chez la femme). Chaque année, plus de 150 000 personnes sont concernées en France. La thrombolyse intraveineuse (TIV) par l'activateur tissulaire recombinant du plasminogène (rtPA, dose unique 0,9 mg/kg, 10% bolus puis 90% en infusion sur 1 heure) dans les 4,5 heures post-ictus est à l'heure actuelle le seul traitement médicamenteux efficace autorisé à la phase aiguë, en urgence, de l'infarctus cérébral. Néanmoins, toutes étiologies confondues, la recanalisation vasculaire post-rtPA n'est observée que chez moins de 50% des patients. Par ailleurs, depuis 2015, l'efficacité de la thrombectomie mécanique (TM) a été formellement démontrée. Un des mécanismes de résistance au tPA est la présence de Neutrophil Extracellular Traps (NETs) au niveau de la coque des caillots sanguins obstruant l'artère. Les Nets sont libérés par les neutrophiles suite à une activation cellulaire. Ces NETs sont constitués d'ADN, d'histones (H3), et de protéines granulaires. Ces Nets induisent des lésions des tissus environnants et ont un rôle majeur dans la formation du caillot de fibrine. En effet, les NETs servent de support au dépôt de la fibrine, favorise une plus grande stabilité et rigidité du caillot de fibrine. La présence de ces NETs au niveau de la

coque du caillot est une véritable barrière à l'action du tPA et impliquent donc des mécanismes de résistance à la thrombolyse. Le ciblage des NETs par un inhibiteur spécifique pourrait ainsi améliorer l'efficacité de la thrombolyse et les résultats fonctionnels.

L'objectif de cette étude, dans deux modèles d'ischémie cérébrale chez la souris, est de mettre en évidence l'impact de l'inhibition de ces NETs via l'injection d'une molécule capable de dégrader ces réseaux : la chondrotéine sulfate (CS). La CS est une molécule déjà utilisée chez l'Homme notamment dans le traitement de l'arthrose.

Ainsi, nous souhaitons étudier la capacité de cette molécule à améliorer la lyse des caillots en synergie avec le tPA et de regarder l'impact sur les lésions cérébrales, la réponse inflammation et la récupération fonctionnelle suite à un AVC ischémique.

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 les modèles 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. Sur 3 ans, 180 souris seront nécessaires pour réaliser cette étude, et l'utilisation d'outils d'imagerie non invasive permettant de mesurer les lésions cérébrale et l'inflammation cérébrale 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'anxiété, la souffrance et la douleur de chaque animal, pouvant être occasionnées pendant le projet. Les principes éthiques et les standards de raffinement seront utilisés jusqu'à la mise à mort de l'animal.

**20059** L'allergie est devenue aujourd'hui un problème de santé publique majeur dans nos pays. Les manifestations peuvent être variables, pouvant conduire à des réactions allergiques graves, voir mortelles. Les traitements de l'allergie restent limités, notamment dans le cadre de l'allergie alimentaire.

Nous développons dans l'équipe de nouvelles approches thérapeutiques spécifiques de l'allergie alimentaire. Deux axes sont envisagés, et pourront être associés. Le premier vise à induire une tolérance face à l'antigène en administrant par voie orale l'antigène vectorisé dans des nanotransporteurs (de type "virus-like particle" : VLP). Le second vise à activer et amplifier la population de lymphocytes T régulateurs, cellules capables de contrôler les réponses immunitaires indésirables. Pour cela, nous administrerons une molécule (l'IL-2 faible dose) capable d'activer spécifiquement cette population. Ces thérapies pourront être combinées, et testées comme des traitements préventifs ou curatifs de l'allergie. L'efficacité des thérapies sera évaluée chez la souris dans un modèle d'allergie alimentaire spécifique de l'ovalbumine. Pour cela, les souris seront



sensibilisées par injection de l'ovalbumine en présence d'adjuvant puis 2 semaines plus tard l'allergie est induite en administrant l'ovalbumine par voie orale tous les 2 jours pendant 10 à 14 jours. La réaction à l'allergène provoque alors une diarrhée et une diminution de température chez les souris rendues allergiques. Nous évaluerons quotidiennement si le traitement permet de prévenir ces signes cliniques de l'allergie.

Pour réaliser ce projet, 2150 souris sont nécessaires sur les 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé se basant sur le principe de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Remplacement. Afin de répondre au critère de remplacement dès que cela est possible dans nos études, les nouvelles molécules à inclure dans nos vaccins ont été identifiées selon un rationnel scientifique et des données préalables décrites dans la littérature ; elles seront testées et validées au préalable dans des expériences *in-vitro* avant de procéder aux études *in vivo*. Ainsi, seules les stratégies validées *in vitro* seront testées chez l'animal. Réduction. Le nombre utile au projet 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. Des études exploratoires sur un petit nombre de souris seront réalisées pour sélectionner les meilleures stratégies avant d'évaluer leur efficacité thérapeutique sur un nombre plus important d'animaux. Raffinement. Par ailleurs, dans tous nos protocoles nous veillerons à raffiner au mieux nos expériences en diminuant systématiquement les contraintes et la douleur qui peuvent être liées à la mise en œuvre expérimentale, incluant une période d'acclimatation systématique avant expérimentation, un hébergement amélioré, des points d'arrêt anticipés et le recours à des anesthésie et analgésie pour limiter la douleur.

**20060** Une surveillance active des maladies virales des poissons au niveau national est indispensable afin de détecter rapidement l'apparition de virus pathogènes et de limiter leur diffusion dans les élevages. En France, trois virus sont particulièrement problématiques chez la truite : le virus de la septicémie hémorragique virale (vSHV), le virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse (vNHI) et le virus de la nécrose pancréatique infectieuse (vNPI). En application de la réglementation Européenne, ces virus sont régulièrement recherchés sur les géniteurs (animaux en âge de se reproduire) dans les élevages de truites arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*), lesquels doivent démontrer l'absence de ces pathogènes sur leurs sites afin de pouvoir commercialiser les œufs de leurs animaux. Dans ce cadre, des analyses virologiques utilisant la méthode de réaction de polymérisation en chaîne (PCR) en temps réel doivent être réalisées sur les produits génitaux (sperme, œufs et liquide coelomique dans lequel baignent les œufs). Ces produits génitaux étant particulièrement riches en molécules pouvant perturber le processus d'analyse, il est indispensable de valider les outils PCR à utiliser afin de s'assurer de leur niveau de performance sur ces matrices. Dans le cadre du développement puis de la validation de méthodes de détection, il est recommandé de travailler sur des échantillons (organes, sang, semences, ...) provenant de poissons infectés par voie naturelle, plus représentatifs des situations potentiellement rencontrées en élevage ou dans l'environnement, que des échantillons issus de poissons sains contaminés avec le pathogène étudié (ajout d'une quantité donnée de virus directement dans l'échantillon avant analyse).

Cette saisine concerne la production de produits génitaux adaptés au moyen de l'infection expérimentale de truites arc en ciel adultes sexuellement matures afin de valider les outils de détection PCR spécifiques du vSHV, du vNHI et du vNPI.

La quantité d'animaux nécessaire sera de 100. Ce nombre permettra de garantir l'obtention de volumes suffisants de produits génitaux naturellement contaminés tout en limitant autant que possible le nombre d'animaux utilisés.

Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux, c'est-à-dire 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 la phase de reproduction. 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'il est indispensable d'avoir recours à une contamination volontaire des animaux pour disposer de matrices infectées .

**20061** Aujourd'hui, une personne sur onze vit avec le diabète. Cette maladie chronique se caractérise par un problème de régulation de la glycémie (taux de sucre dans le sang). La glycémie est normalement finement contrôlée par plusieurs facteurs, dont l'insuline produite par le pancréas, la seule hormone qui permet de diminuer la glycémie. Elle agit comme une clé qui permet au glucose de passer du sang dans nos cellules. Le glucose est vital car c'est la principale source énergétique de nombreux organes. Lorsque la production ou l'action de l'insuline n'est plus suffisante, la glycémie augmente : c'est ce que l'on appelle une hyperglycémie. A long terme, les hyperglycémies chroniques et répétées induisent des dommages importants dans l'organisme. Parmi les complications du diabète, on trouve ainsi certaines maladies cardiovasculaires et neuronales, l'insuffisance rénale, la perte de la vue et l'amputation des membres inférieurs.

Pour envisager de nouvelles thérapies, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes biologiques responsables de cette maladie. Ces dernières années, plusieurs études ont montré qu'une protéine, appelée « récepteur cannabinoïde de type 1 » abrégé en « CB1 », avait des effets importants sur la régulation de la glycémie et du poids corporel. Ce récepteur est appelé « cannabinoïde » car les molécules contenues dans le cannabis peuvent s'y fixer. Il existe cependant des molécules produites par notre corps, appelées « endo-cannabinoïdes » qui se fixent également sur ce récepteur. Lorsqu'il est activé, le récepteur CB1 est capable, entre autres, de réguler la production d'insuline par le pancréas, même si les mécanismes exacts ne sont pas encore tous connus. Dans ce contexte, une question en particulier reste à explorer : le récepteur CB1 est présent à la fois à la surface et à l'intérieur de nombreuses cellules de notre corps, mais l'impact de cette localisation sur son rôle dans la régulation de la glycémie est à ce jour inconnu.

Le but de ce projet est donc d'étudier le rôle des différents récepteurs CB1, présents à la surface cellulaire ou à l'intérieur des cellules, dans la régulation de la glycémie. Pour ce faire, nous étudierons des souris transgéniques pour lesquelles les cellules du pancréas qui produisent l'insuline n'auront plus aucun récepteur CB1, ou uniquement sa forme présente à la surface. Ces manipulations génétiques nécessiteront dans certains cas d'injecter un virus dans le pancréas au cours d'une chirurgie. Enfin, ces souris seront nourries avec une alimentation standard ou hypercalorique, pour déclencher l'apparition d'un diabète. Nous évaluerons alors la régulation de la glycémie chez ces animaux.

Au total, nous utiliserons un maximum de 382 souris sur 5 ans, dans le strict respect de la règle des 3Rs, comme détaillé ci-dessous.

**Remplacer** : la souris est le modèle de choix pour notre projet car il nous permet d'étudier des individus génétiquement modifiés dont la physiologie générale est suffisamment proche de celle de l'être humain. Ainsi, nous serons en mesure d'obtenir des informations médicalement pertinentes. De plus, les mécanismes biologiques que nous étudions (glycémie et sécrétion d'insuline) impliquent un processus de communication entre le pancréas et le reste du corps. Il est donc nécessaire d'étudier un organisme vivant entier, qu'aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut remplacer. **Réduire** : nous avons optimisé les protocoles afin de réduire le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été utilisés pour prédire le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats statistiquement fiables.

**Raffiner** : une attention particulière sera accordée au bien-être des animaux. Les souris seront logées dans des cages collectives (quand les expériences le permettent) dans une pièce dédiée, avec une régulation de la température, de l'humidité et de la lumière. L'enrichissement des cages permettra en outre aux animaux de reproduire certains comportements naturels : carrés de cellulose pour la nidification, bâtonnet en bois pour ronger, tunnel en carton pour se cacher. Avant chaque expérience, les animaux seront manipulés fréquemment pour les habituer aux expérimentateurs et ainsi réduire leur stress. Néanmoins, pour étudier finement leur régulation glycémique, il nous sera nécessaire de les isoler ponctuellement. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale,

sur tapis chauffant pour prévenir tout risque d'hypothermie. Un protocole analgésique associant un morphinique et un anti-inflammatoire sera également mis en place. Enfin, pour chaque procédure du projet, des points limites précoces et terminaux ont été définis, afin maintenir le bien-être des animaux à un niveau optimal.

**20062** L'objectif du projet est de modifier le génome de nos animaux puis d'étudier les conséquences de ces modifications sur les générations futures. La technologie CRISPR, aussi appelée ciseaux moléculaires, permet de modifier avec grande précision le génome d'un organisme. Le gène BCMO1 est un gène majeur du métabolisme des bêta-carotènes et de la vitamine A. Sa fonction dans la couleur de la viande de poulet est actuellement bien connue mais il est nécessaire de bien la comprendre au niveau digestif (site majeur d'expression du gène) ainsi que dans les différents tissus de l'organisme. Pour cela, le projet rassemblera des expertises complémentaires de différentes équipes de recherche en génétique moléculaire, biotechnologies de la reproduction, expérimentation et phénotypage.

La mutation du gène BCMO1 est une mutation de type KO, mais les phénotypes attendus ne sont pas dommageables pour l'animal. En effet, il existe 2 voies pour la production de vitamine A et les deux voies peuvent se compenser. Cette étude permettra de mettre en évidence le rôle spécifique de BCMO1 sans altérer la vie de l'animal.

Le projet se décline en plusieurs étapes: production des cellules reproductrices éditées, injection de ces cellules dans des œufs receveurs, éclosion et élevage de ces animaux qui sont porteurs germinales de la mutation.

Notre protocole d'expérimentation répond à la règle de 3R :

-Remplacer. Vu qu'il s'agit de démontrer l'implication d'un gène dans un phénotype d'intérêt chez le poulet, l'espèce receveuse la plus adaptée est le poulet et aucun test *in vitro* ne peut remplacer les étapes *in vivo*.

-Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au minimum informatif et est basé sur les publications récentes sur le sujet. Cependant, vu la variabilité des taux de réussite rapportée, la prévision exacte ne peut être réalisée. Cela comprendra un total maximum de 750 animaux (mâle et femelle) sur 5 ans pour la production de plusieurs générations d'animaux. Pour la première génération, 300 poussins seront produits. Pour les générations suivantes, 150 animaux seront utilisés par génération.

-Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions similaires à celles des poulets d'élevage avec de l'enrichissement et le placement en cage individuelle est limité au strict nécessaire. Les animaux sont manipulés par du personnel formé et une réduction de la douleur lors des procédures expérimentales sera mise en place. Un enrichissement de milieu est aussi mis en place (bloc à piquer, sel, pesons). L'utilisation de points limites adaptés et de critères d'arrêt est prévu pour chaque procédure expérimentale.

**20063** Dans un contexte global où les productions aquacoles sont de plus en plus plébiscitées, paradoxalement, la production française en pisciculture d'étang décline alors qu'elle représente le plus fort potentiel, y compris à l'échelle européenne. Outre son rôle dans la production de poissons, l'étang joue un rôle dans la régulation de l'environnement et comme support de biodiversité. Fort de ces constats, l'objectif de ce projet est de proposer de nouvelles pratiques pour la pisciculture d'étang. La définition de la composition de la polyculture sera le thème central de ce projet, c'est-à-dire d'être capable de définir les différentes espèces de poissons à élever et d'en établir leurs effectifs. Ces propositions de pratiques prendront en compte l'ensemble des compartiments biologiques du système et la diversité qui le compose pour produire la ressource de manière plus durable. Ce projet s'appuie sur une co-construction de scénarii avec des représentants professionnels et sur une démarche expérimentale en station expérimentale d'étangs.

Les objectifs du projet sont :

- Comparer la productivité d'une polyculture de poisson ayant pour vocation de valoriser les ressources naturelles de l'étang en conduite ouverte ou en conduite compartimentée (limitant l'accès aux ressources naturelles de l'étang de façon temporaire),
- Evaluer la productivité globale et la biodiversité associée lors des conduites ouvertes ou compartimentées de la polyculture,
- Maximiser la croissance des carnassiers (jeunes sandres) via l'effet de zones isolées sur leur disponibilité en ressources alimentaires et donc sur leur développement/croissance,
- Contrôler la croissance de chacune des espèces pour évaluer la productivité globale du système d'élevage
- D'évaluer l'effet de ces zones végétalisées aussi sur la qualité de l'eau, via le suivi des indicateurs physico-chimiques de l'eau,
- Recueillir des éléments permettant la modélisation des liens trophiques dans cette polyculture et selon les deux modalités.

Ainsi, les modalités techniques de l'expérience sont les suivants :

- Deux traitements expérimentaux constitués chacun d'un étang de 1000 m<sup>2</sup>, soit non modifié (conduite ouverte), soit compartimenté en 3 zones (conduite compartimentée). Les deux traitements sont empoisonnés du même effectif de chaque espèce.
- Chaque traitement expérimental est répliqué trois fois: polyculture menée en conduite ouverte et polyculture menée en conduite compartimentée, soit 6 étangs au total dans le dispositif expérimental
- Chaque étang est empoisonné avec 1318 individus provenant de 4 espèces différentes (27 Carpes communes, 155 gardons, 12 tanches, 1124 sandres), soit 7908 poissons au total.

La démarche 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) a été prise en compte dans le design de l'expérience. L'utilisation d'animaux est nécessaire dans cette approche qui se veut proche des mesures zootechniques classiques. De plus, ce travail soutient une démarche de modélisation qui devrait, à terme, permettre de se passer des travaux d'expérimentation. Le choix d'utiliser des étangs de petite taille (1000 m<sup>2</sup>) permet de limiter le nombre de poissons mobilisés pour l'expérience. Dans l'optique de raffiner, les conditions d'élevage ont été aménagées afin de préserver les herbiers et la biodiversité spontanée de l'étang et concourir au bien-être des poissons. Le nombre de prélèvements de tissus sur les poissons a été réduit à son minimum acceptable pour la représentativité statistique acceptée dans les analyses isotopiques. Les prélèvements sont réalisés sur des animaux morts après euthanasie.

**20064** La cécité est un problème de santé publique qui handicape gravement les personnes atteintes et qui concerne un français sur 1000. Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques afin de restaurer la vision chez ces patients. Une voie thérapeutique possible est de stimuler les neurones de la rétine encore présents.

Notre stratégie consistera à exprimer des protéines photosensibles dans des cellules de rétines aveugles de manière à les rendre sensibles à la lumière. Afin de trouver la stratégie thérapeutique la plus efficace possible, il nous faut comprendre comment les différents neurones qui forment le réseau rétinien travaillent ensemble pour traiter l'information visuelle.

Notre projet se décompose donc en deux parties.

Dans la première partie, nous tenterons de comprendre le rôle des différents types cellulaires dans le traitement de l'information visuelle. Nous utiliserons des souris normales ainsi que des modèles murins permettant une expression cellule-spécifique des protéines photosensibles.

Dans un second temps, nous tenterons de redonner la vision à des souris aveugles. Nous utiliserons un modèle murin de rétinopathie pigmentaire couramment utilisé par la communauté scientifique.

Les protéines photosensibles seront administrées par voie intraoculaire à l'aide de vecteurs viraux. Suite aux injections, nous effectuerons uniquement des fonds d'œil sur l'animal vivant. L'ensemble

des études nécessaires se feront *ex vivo* (analyses immunohistochimiques, fonctionnalité) après euthanasie de l'animal. Pour l'histologie, nous aurons recours à une euthanasie par perfusion au paraformaldéhyde qui nous permet des analyses histologiques des tissus dans un état proche d'une situation ante mortem.

Au total 2600 souris seront nécessaires à cette étude en incluant les contrôles.

En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » :

Remplacement :

L'étude de l'efficacité de protéines optogénétiques dans la rétine ne peut être testée sur des modèles de cellules *in vitro*. Le recours au modèle animal est indispensable à l'objectif scientifique de ce projet.

Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum pour pouvoir obtenir suffisamment de données statistiquement significatives et atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus ; il a été défini en se basant sur des études passées utilisant une technique similaire.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans des cages de stabulation avec enrichissement, alimentation et abreuvement à volonté.

Une observation quotidienne est effectuée pour s'assurer du bien être des animaux.

Une signalétique particulière est utilisée pour la surveillance des animaux en expérimentation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne lors des injections intraoculaires.

Les animaux commerciaux observent une période d'acclimatation de 5 jours minimum.

Des critères d'arrêt (points limites) sont définis pour chaque procédure expérimentale.

**20065** Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI: maladies de Crohn et rectocolite hémorragique) touchent 10 millions de personnes dans le monde et 8000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Ces maladies sont caractérisées par une inflammation du tube digestif et des lésions de la muqueuse intestinale. Il n'existe pas de traitement curatif des MICI et les thérapies actuelles visent à limiter l'inflammation. Cependant une nouvelle approche ciblant la réparation du tissu permettrait le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ce projet se concentrera sur l'étude de l'IFN- $\lambda$ , un médiateur immunitaire impliqué dans les processus d'inflammation et de réparation tissulaire. L'IFN- $\lambda$  est induit par des stimuli microbiens et nous avons montré dans un modèle de colite chez la souris que ce médiateur avait un double effet, il peut freiner la capacité des cellules épithéliales à réparer la muqueuse intestinale mais limite aussi la libération de médiateurs toxiques par les cellules inflammatoires.

De façon intéressante, les taux d'IFN- $\lambda$  sont élevés dans les biopsies des patients MICI mais les raisons ne sont pas connues. Comprendre comment l'IFN- $\lambda$  régule la réponse immunitaire et épithéliale est donc fondamental, à la fois pour définir son rôle protecteur anti-inflammatoire et son action délétère sur la réparation tissulaire.

Nos objectifs sont les suivants:

- 1) Comprendre comment l'IFN- $\lambda$  influence la capacité des cellules épithéliales à réparer les muqueuses
- 2) Déterminer de quelle manière la flore intestinale stimule la production d'IFN- $\lambda$

Les MICI sont des pathologies basées sur des interactions cellulaires entre la barrière intestinale et les microbes commensaux. L'analyse de l'organisme entier est indispensable à la compréhension de ces processus complexes et la souris est le meilleur modèle d'étude des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des souris sauvages provenant d'un fournisseur agréé et des souris transgéniques élevées dans notre établissement.

La règle des 3R sera suivie.

Réduction: dans la mesure du possible, nous limiterons le nombre d'animaux au minimum requis pour obtenir des tests statistiques fiables. Les modèles de colite utilisés dans le projet sont déjà bien calibrés et ne nécessitent donc pas d'animaux supplémentaires pour optimiser les protocoles. Nous pouvons prélever de nombreux échantillons différents sur le même animal, ce qui réduit le nombre total de souris nécessaires à l'étude. De plus, le nombre d'animaux requis pour obtenir des résultats statistiquement significatifs a été calculé sur la base de résultats préliminaires. Ces calculs garantiront l'utilisation d'un nombre minimal d'animaux.

L'utilisation de 2850 souris sera nécessaire pour finaliser l'ensemble du projet.

Raffinement: les souris seront élevées dans animaleries conventionnelles et de niveau 2 exemptes d'organismes pathogène spécifique. La température, l'hygrométrie et la photopériode sont contrôlées et régulées. Les animaux seront hébergés dans des cages appropriées à raison de 5 par cage et disposeront de matériel pour confectionner des nids et des dômes protecteurs. Le phénotype des souris génétiquement modifiées n'est pas dommageable. Seuls les modèles de colite entraîneront une altération de l'état de santé des souris. Les animaux seront surveillés de façon quotidienne et seront mis à mort à une date fixe en fonction du modèle utilisé. Dans tous les cas la détection d'un point limite limitera autant que possible la souffrance des animaux. Ils seront mis à mort dès l'apparition d'un des points limites suivants : perte de poids supérieure à 20% du poids initial, prostration dans la cage, baisse de la température.

Remplacement: La compréhension des mécanismes impliqués dans la colite nécessite l'étude des interactions entre les cellules épithéliales, le système immunitaire et le microbiote intestinal et il n'y a pas de modèle *in vitro* permettant de récapituler la pathologie. La souris, dont la physiopathologie est proche de l'homme, reste à ce jour le meilleur modèle pour comprendre les MICI.

**20066** La maladie du foie gras (NAFLD) est parmi les maladies hépatiques chroniques les plus fréquentes dans le monde et est souvent associée avec des anomalies métaboliques (obésité, diabète). La NAFLD se caractérise par l'accumulation de gras dans le foie (appelé stéatose). De façon chronique, la stéatose peut provoquer une inflammation puis une fibrose hépatique. Les processus moléculaires conduisant au développement de la fibrose et de l'inflammation sont peu connus. L'équipe a récemment identifié l'Apolipoprotéine F (ApoF) comme facteur dont le niveau d'expression est fortement diminué chez les patients qui ont NAFLD le plus sévère. L'ApoF est synthétisée et sécrétée par le foie et se trouve dans le sang en association avec les lipoprotéines plasmatiques et peut donc agir sur le foie mais aussi le tissu adipeux et le muscle. Nos études préliminaires indiquent que la diminution de l'expression de l'apoF altère les capacités de stockage et de sécrétion des lipides par le foie. De plus, la surexpression de l'ApoF chez la souris réduit fortement le taux de lipides dans le sang et aurait un effet protecteur contre les maladies cardiovasculaires.

Cette étude a été conçue dans le but d'étudier le rôle de l'apoF dans le métabolisme lipidique dans le contexte de NAFLD. Nous modulerons l'expression de l'ApoF dans le foie (sa seul site d'expression) en utilisant des méthodes virales et non-virales puis nous étudierons les effets sur la production de triglycérides par le foie et leur utilisation par les tissus adipeux et musculaires. Nous étudierons également si les changements observés peuvent conduire à l'aggravation du NAFLD. L'étude de la régulation des lipides dans les conditions physiologiques et pathologiques nécessite des études sur organisme entier qui ne peuvent être réalisées que par le biais de modèles animaux adaptés.

Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique. Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne présentent aucun problème physique ou physiologique. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant 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. **NOUS UTILISERONS UNIQUEMENT LA SOURIS COMME MODÈLE ANIMALE DANS NOS ÉTUDES ET NOUS AVONS ÉTUDIÉ DES ALTERNATIVES AFIN DE REDUIRE, RAFFINER, ET REMPLACER L'UTILISATION DES ANIMAUX VIVANTES.**

Nombre d'animaux utilisés: 578

**20067** 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.

L'un des principaux challenges dans le contexte de l'étude des effets sur la santé de la pollution atmosphérique résulte de l'extrême complexité du mélange atmosphérique : à n'importe quel point de l'espace, des milliers d'espèces de polluants ayant une diversité chimique énorme coexistent, produisant une réactivité chimique hautement modulée avec le temps du fait de la transformation rapide de nombreuses espèces sur des échelles de temps allant de la seconde à la minute. La pollution atmosphérique est ainsi constituée d'un mélange complexe de plusieurs milliers de composants qui évoluent dans le temps et dans l'espace. Du point de vue de la santé, les constituants de la pollution atmosphérique les plus souvent associés à des effets délétères sont les polluants gazeux (comme l'ozone, le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, ...) et les particules. Cependant, la pertinence d'une telle approche basée sur l'étude des composants isolés de la pollution est entamée du fait de l'absence de considération de la synergie suspectée entre les différents constituants de la pollution atmosphérique. Nous disposons d'un système unique permettant de soumettre des animaux à des atmosphères polluées complexes, système permettant d'aborder de manière pertinente et réaliste la problématique des effets de ces pollutions sur la santé. Nous nous intéressons particulièrement aux effets de la pollution atmosphérique sur l'évolution de la mucoviscidose, pathologie pour laquelle aucun traitement n'est disponible à ce jour. D'origine génétique, la mucoviscidose semble indépendante d'une influence de l'environnement. Pourtant, elle se caractérise aussi par une expression très variable de la maladie (dans sa sévérité notamment), les déterminants de cette variabilité restant 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'hypothèse est ici qu'une caractérisation de l'exposition des patients 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 utiliserons des souris génétiquement modifiées comme modèles de mucoviscidose. Nos objectifs consistent à déterminer l'impact d'une pollution atmosphérique complexe sur la fonction de la protéine mutée dans la mucoviscidose mais également les conséquences respiratoires sur le long terme d'une telle pollution. Nous travaillerons ainsi sur 3 atmosphères modèles, représentatives de la pollution atmosphérique présente dans une zone urbaine très polluée (Pékin) et une zone urbaine européenne moyennement polluée (Paris) tout en prenant en compte le facteur de saisonnalité (été et hiver).

Les souris seront exposées aux différents atmosphères (pic de pollution de 72 heures) grâce au couplage de la chambre de simulation atmosphérique avec des isolateurs permettant l'hébergement des souris dans leur cage ventilée, sans modification de leur environnement proche. Tout au long de ces études, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Nous limiterons ainsi le projet aux seules expériences indispensables, tout en tenant compte des contraintes liées à l'utilisation de l'enceinte d'exposition. En effet, un seul type d'atmosphère peut être généré en même temps, ce qui implique la répétition des groupes "Air non pollué" pour chaque lot expérimental.

Le modèle murin choisi est celui le plus couramment utilisé dans la communauté scientifique de la mucoviscidose. Puisque les objectifs de notre étude sont d'évaluer les effets de la pollution atmosphérique sur le cours de la maladie mucoviscidose, il est donc très pertinent de vouloir utiliser

un tel modèle. Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 360 souris au total. Toutes les souris seront suivies afin d'évaluer leur comportement et par conséquent leur bien-être. Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, avec mise en place de points limites précis (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer...) qui permettront d'éviter toute souffrance. Pour enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés. Les études *in vivo* sont effectivement les seules permettant l'étude de 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.

**20068** Titre: Mise au point de traceurs neuronaux chez le rat

Durée: 60 mois

Mots-clés: rat, anatomie, cerveau, neurone, connexions

Finalité: Recherche fondamentale

Objectifs et bénéfices escomptés.

Le cortex cérébral est la principale région du cerveau pour les fonctions cognitives supérieures. L'élucidation des mécanismes neuronaux qui assurent la cognition est nécessaire si nous voulons progresser dans la compréhension des nombreux facteurs qui ont un impact négatif sur la cognition, comme le vieillissement et les maladies. Notre objectif est de déterminer les principes d'organisation qui régissent la formation des connexions entre les différentes aires corticales en réalisant des injections de traceurs dans des zones spécifiques. Cette technique nous a permis de déterminer la connectivité des aires corticales qui se trouvent à la surface du cortex. Cependant, de nombreuses aires corticales sont situées en profondeur. Actuellement, il est extrêmement difficile d'injecter ces zones profondes, car le traceur peut s'échapper de la seringue, ce qui entraîne une contamination des tissus. Surmonter cette difficulté permettra une bien meilleure couverture du cortex et nous permettra d'établir la connectivité complète du cortex.

Aspect fondamental de nos Recherches. Le cortex cérébral joue un rôle crucial dans la perception, la cognition, la mémoire et le contrôle moteur. Le signal électrique y est relayé par une succession des neurones individuels formant un dense réseau. Le réseau du cortex concerne les connexions relayant les signaux entre les 150 aires corticales individuelles spécialisées dans la perception, la cognition, le contrôle moteur. Notre objectif global de recherche est d'obtenir un connectome cortical méso-échelle, pour cela nous utilisons le macaque qui est un modèle de choix pour les neuroscientifiques du monde entier, puisqu'il possède de nombreuses aires corticales homologues à celles de l'humain, avec des propriétés perceptuelles comparables. Nous devons ici procéder à un développement technique afin de perfectionner les caractéristiques du traceur que nous injectons dans le cortex, les difficultés mentionnées ci-dessus concernant l'injection de traceurs dans les zones profondes du cortex du macaque font que nous avons beaucoup de mal à compléter le connectome. Pour surmonter ces difficultés, nous devons être en mesure d'injecter un traceur dont la viscosité (c'est-à-dire la texture) est similaire à celle du cerveau. Nous devons injecter le traceur dans des blocs de gélatine qui ont été préparés pour avoir exactement la même viscosité que le cerveau. Cela nous permettra d'examiner comment le traceur injecté se comporte dans le cerveau. Les études préliminaires suggèrent que c'est la faible viscosité du traceur qui fait qu'à la sortie de l'aiguille, il est repoussé à l'extérieur de l'aiguille, ce qui entraîne une contamination du tissu sus-jacent. À une viscosité optimale, nous prévoyons que le traceur restera à l'extrémité de l'aiguille, sans diffuser dans les zones adjacentes. Pour voir si cela fonctionne réellement, nous devons réaliser des injections du traceur chez le rat afin d'en déterminer la viscosité optimale.

Nuisances prévues.

Les animaux sont soumis à un acte chirurgical nécessitant une anesthésie générale avec des analgésiques pre et post-opératoire. Les injections de traceurs sont réalisées en pratiquant une ouverture dans l'os du crâne et de la dure-mère.



L'ouverture de la membrane peut provoquer des saignements qui doivent impérativement être contrôlés pour le maintien de l'intégrité des tissus cérébraux. Une attention particulière est portée à l'animal après la chirurgie. Une fiche de suivi nous permet d'évaluer en fonction de critères spécifiques à l'espèce les signes indicateurs de gêne ou de souffrance et d'adapter le traitement antidouleurs. Après le délai nécessaire pour assurer le transport axonal rétrograde des traceurs, l'animal est profondément anesthésié puis mis à mort, le cerveau est extrait puis traité pour analyse du tissu cérébral.

Espèces et nombre d'animaux utilisés: 36 rats

Degré de gravité des procédures : procédure de gravité modérée

Remplacement

Nous ferons une étude préliminaire *in-vitro* en injectant le traceur dans des blocs de gélatine préparés préalablement pour avoir exactement la même densité que le cerveau. Cela nous permettra d'examiner comment le traceur injecté peut se comporter dans le cerveau. Nous effectuerons ces mises au point chez le rat *in vivo*, ce qui nous permettra d'optimiser les traceurs que nous utiliserons ensuite chez le singe sans avoir besoin de nouvelle mise au point. L'étape *in vitro* constitue un remplacement partiel de l'étude *in vivo*

Réduction

Notre expérimentation *in vitro* nous permettra de déterminer les paramètres de base qui doivent être abordés : Quelle serait la viscosité idéale ? Quel serait le volume idéal ? A quelle vitesse les injections devront-elles être effectuées pour minimiser la perturbation de la gélatine ? Ces résultats *in vitro* nous permettront de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires pour déterminer les paramètres les mieux adaptés au cerveau vivant. Nous allons donc effectuer une vérification paramétrique des résultats chez le rat qui, nous l'espérons, permettra de minimiser le nombre de singes utilisés dans les expériences.

Raffinement

Pour réduire le stress des animaux après leur arrivée à l'animalerie, nous respecterons une période de 7j d'acclimatation aux conditions ambiantes de l'animalerie avant toute procédure. Les animaux sont hébergés en cage de stabulation avec à leur disposition plusieurs formes d'enrichissement (nid de fibres de coton, tunnels en carton, igloos teintés en polycarbonate) afin de réduire ennui/stress. Une attention particulière est portée à l'animal après la chirurgie. Une fiche de suivi nous permet d'évaluer en fonction de critères spécifiques à l'espèce les signes indicateurs de gêne ou de souffrance et d'adapter le traitement antalgique si nécessaire. Le suivi de la douleur sera évalué par 2 ou 3 personnes indépendantes (expérimentateurs et zootechniciens).

**20069** La transplantation d'organes connaît certaines limites et ce quel que soit la nature de l'organe concerné. La première limite est que le nombre de patients en attente de greffe croît plus rapidement que le nombre d'organes disponibles (faible nombre de donateurs). La seconde limite est que la qualité des transplants disponibles ne correspond pas toujours aux critères anatomiques, physiologiques et/ou biochimiques définis comme optimaux par l'Agence de Biomédecine (ABM) avec un recours à des transplants dits « marginaux ». Enfin, les conditions de conservations / préservations entre le prélèvement et la transplantation permettant de maintenir les critères de sécurité et de qualité définis par l'ABM, peuvent varier d'un organe à un autre selon leur fragilité.

Dans ces conditions, l'objectif de ce projet est de mettre au point de nouvelles modalités de la préservation / conservation des transplants (entre le prélèvement et la transplantation), par des techniques de perfusion dynamique en hypothermie ou en normo-thermie suivant les organes et suivant l'avancée des connaissances et des recherches dans le domaine, par rapport à une conservation statique hypothermique (standard actuel). Les organes d'intérêt sur lesquels nous souhaitons progresser dans les conditions de perfusion dynamique sont le rein, le pancréas, le foie, l'utérus, le bloc cœur-poumon et l'intestin. Pour chacun des organes perfusés *ex situ*, nous étudierons des critères d'évaluation macroscopique, microscopique en immunohistochimie et réaliserons des analyses sur le liquide de perfusion. Des marqueurs spécifiques à chacun des

organes seront également étudiés. Ce projet constitue une première étape, avant de réaliser des études plus spécifiques d'organe, qui pourront étudier le pré-conditionnement et/ou des pré-traitements d'organe ex situ durant cette période de préservation.

Ces organes seront prélevés selon les protocoles de l'ABM. Le nombre maximum d'animaux utilisés dans cette étude sera de 60 (maximum de 10 par organe).

Réduction: parallèlement au prélèvement de l'organe d'intérêt, d'autres organes et/ou tissus pourront être prélevés secondairement de façon à diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés et à potentialiser l'utilisation de chaque animal.

Remplacement : il n'existe pas de remplacement possible pour l'étude de ces organes, cependant l'utilisation de ces animaux répond aux exigences de réduction et de raffinement.

Raffinement : dans un souci de limiter le stress et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale, et un traitement antalgique adapté sera mis en place en amont de l'intervention.

Les porcs avant expérimentation, sont hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce selon leur taille et leur comportement. Un enrichissement alimentaire (fruits et/ou légumes) est apporté quotidiennement, un enrichissement par jeux (différentes activités) est apporté en rotation dans les boxes selon un programme hebdomadaire.

**20070** La demande de lait et de viande issus des ruminants augmente, suite à la croissance de la population mondiale et à l'amélioration des conditions socio-économiques dans des pays émergents. Pourtant, la durabilité des systèmes de production de ruminants est une préoccupation mondiale au vu de la raréfaction des ressources (terres, aliments, ...) et du changement climatique. Les microbiomes symbiotiques associés aux différents sites corporels des ruminants jouent un rôle essentiel dans la physiologie, la santé, la productivité et l'adaptation à l'environnement. Comprendre et maîtriser ces microbiomes est fondamental pour améliorer l'efficacité et la durabilité des systèmes de production animale.

Ce travail propose d'élucider le rôle des microbiomes associés aux ruminants et leur interaction avec l'animal hôte au début de la vie et pendant des événements fondamentaux de la vie (par exemple, le sevrage, la transition alimentaire et la lactation), qui sont connus pour affecter la santé, le bien-être et l'efficacité environnementale dans les systèmes de production de ruminants. Nous adopterons une approche longitudinale pour étudier l'établissement, le maintien et les implications ultérieures pour la santé et la fonction immunitaire des microbiomes sur quelques sites corporels clés et représentatifs des ruminants laitiers. L'établissement dès la naissance des microbiomes ruminal, fécal, bucal et nasal sera étudié chez 60 veaux génotypés, issus de deux races différentes, soit 2 fois 30 veaux, et leurs mères, soit au total 120 animaux. Le travail en France fait partie d'une large étude répliquée en plusieurs endroits en Europe et au Moyen-Orient, avec l'utilisation de 500 animaux au total dans le projet global. Cette étude tiendra compte de la variabilité entre les races, les stratégies de gestion, les systèmes de production et les régimes alimentaires.

Le principe des 3R a été pris en compte dans la construction du projet :

- Remplacement : les mécanismes étudiés mettent en jeu des interactions complexes au sein de l'hôte qu'il est impossible de reproduire dans un modèle cellulaire, de culture d'organe ou dans une autre espèce.

- Réduction : le choix du nombre de veaux intégrés dans cette étude est basé sur le type d'analyse et des données précédentes. De plus les animaux concernés n'ont pas été procréés spécifiquement pour cette étude, ils entreront dans un autre protocole expérimental à leur 1er vêlage.

- Raffinement : les conditions d'hébergement, d'alimentation, de prophylaxie et de traitement des animaux ne sont pas modifiées par la mise en oeuvre du projet. Les divers prélèvements seront assurés par du personnel expérimenté, avec des moyens de contention et du matériel adaptés.

**20071** La neurogenèse est le processus qui permet de fabriquer des neurones à partir de cellules souches du système nerveux et du cerveau en particulier, au cours du développement embryonnaire mais également après la naissance.

Le contexte scientifique du projet est d'identifier et comprendre les mécanismes moléculaires qui sont en jeu dans ces cellules souches et qui régissent leur prolifération (division cellulaire) et leur différenciation en neurones matures.

La neurogenèse du bulbe olfactif (région du cerveau qui reçoit l'information sensorielle olfactive en provenance de la muqueuse de la cavité nasale) représente un modèle principal pour étudier les différents aspects de la production des neurones tels que la biologie des cellules souches, la détermination neuronale, la migration et la différenciation cellulaire. De plus ces cellules souches sont capables de se détourner de leur fonction première en condition pathologique pour participer à la réparation du cerveau en cas de lésion.

Le bulbe olfactif est un des 2 seuls territoires du cerveau où de nouveaux neurones sont produits continuellement au cours de la vie chez les mammifères et présente un potentiel intéressant pour des approches de thérapie cellulaire dans des modèles de maladies neurodégénératives. L'objectif de ce projet est de comprendre le rôle d'ARNs non codants dans les mécanismes qui contrôlent les premières étapes de la neurogenèse en examinant leur fonction *in vivo* dans le cerveau de souris, c'est à dire en condition physiologique. En effet, la neurogenèse est un processus qui dépend de l'environnement cellulaire dans le tissu nerveux et de l'environnement olfactif dans lequel évolue l'animal.

L'ensemble de ces critères fait qu'il est indispensable d'étudier ce processus *in vivo*. Nous utiliserons la souris comme modèle d'étude et nous appliquerons des procédures impliquant l'introduction de molécules dans les cellules souches du cerveau.

Remplacement : L'effet des molécules d'ARN non codants, que nous utiliserons dans ce projet, a préalablement été testé dans un système *in vitro* de culture cellulaire. Les résultats obtenus ont permis de conclure à la pertinence de poursuivre l'étude de ces molécules *in vivo* chez la souris.

Reduction : Nous utiliserons une approche expérimentale simple et rapide qui permet de modifier l'information génétique des cellules souches directement dans le cerveau de souris nouveau-nés sans avoir besoin de créer des animaux transgéniques. Cette approche par électroporation *in vivo* est utilisée depuis plusieurs années dans le laboratoire. Grâce à notre expérience et notre maîtrise de cette technique, notre taux de réussite est optimal et nous pouvons estimer au plus juste le nombre d'animaux suffisants à utiliser pour avoir des résultats reproductibles et tenant compte du taux d'échec des expériences réalisées par la suite sur les échantillons biologiques. Les groupes témoins et les groupes tests seront constitués à partir de mêmes portées, sans distinction de sexe, afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Dans le projet nous utiliserons aussi une lignée de souris transgénique non dommageable (lignées Brainbow) qui permet de suivre le devenir des cellules souches grâce à l'expression de protéines fluorescentes.

Grâce aux formations suivies en biostatistique sur des petits échantillons et à l'expérience acquise de l'analyse statistique de résultats obtenus en utilisant ces méthodes dans d'autres projets qui ont déjà obtenu une autorisation, le nombre d'animaux pour ce projet a pu être réduit au strict nécessaire : 1639 nouveau-nés (1494 non altérés+ 145 transgéniques).

Raffinement : Les souris sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements enrichis par la présence de tunnel en carton, carré de coton et dôme pour la nidification, au sein d'une animalerie exempte de pathogènes et dont les paramètres physiques et sanitaires sont strictement contrôlés. 6 personnes sont dédiées à l'organisation, l'entretien des élevages et le soin aux animaux. Après l'expérimentation, les souris sont hébergées au calme dans une salle postopératoire dédiée avec un suivi clinique quotidien. Les souriceaux d'une portée continuent d'être élevés tous ensemble avec leur mère. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître douleur et anxiété, agir lorsque les points limites prédéfinis sont atteints, noter les observations faites et les actions entreprises.

**20072** Le syndrome métabolique désigne la présence d'un ensemble de troubles physiologiques, qui accroissent le risque de développer un diabète de types 2 des maladies cardiaques ou la survenue d'accidents cardiovasculaires. Parmi ces troubles on retrouve le surpoids et obésité, un taux élevé de triglycérides dans le sang, l'hypertension, une glycémie élevée ou encore un rapport faible de « bon » cholestérol (HDL).

D'après l'OMS, rien que pour le diabète de type II, plus de 422 millions d'individus dans le monde en 2014 étaient concernés, 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). Le syndrome métabolique toucherait 25% de la population adulte aux états unis et jusqu'à 40% pour la tranche d'âge des plus de 60 ans.

Les personnes présentant un syndrome métabolique font face à une diminution de leur qualité de vie et elles ont 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 dans le cas du diabète de type II ou encore des statines en cas d'hypercholestérolémie, 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 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 le risque de développer des complications.

L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement des altérations métaboliques associées au syndrome métabolique 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 des altérations métaboliques en nourrissant les animaux avec un régime riche en graisse, sucres, sel (mimant les mauvaises habitudes alimentaires impliquées en partie dans le développement des maladies métaboliques chez l'homme) durant plusieurs semaines. Il est également possible d'étudier ces pathologies en utilisant des animaux présentant une hyperphagie (surconsommation alimentaire) naturelle comme la souris « db/db » ou encore en utilisant des animaux naturellement hypertendus comme le rat « SHR ».

Ce projet global de type nutritionnel nécessitera l'utilisation maximale de 1800 souris, 600 rats et 800 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 (3R) de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

**20073** 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. 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 par exemple 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).

Dans ce projet nous étudierons donc les déterminants génétiques des réponses comportementales à l'alcool ainsi que la possibilité de bloquer ces réponses par des agents pharmacologiques. Les comportements associés à la consommation d'alcool sont sous-tendus par des processus complexes au sein du système nerveux central et, à l'heure actuelle, les méthodes alternatives ne permettent pas l'utilisation de culture cellulaire ou de modélisation computationnelle pour l'étude de tels comportements. Nous utiliserons donc des souris dans ce projet. Pour ce faire nous aurons, en partie, recours à des animaux génétiquement modifiés de phénotype non-dommageable. L'utilisation des souris est tout à fait appropriée dans ce projet d'une part pour avoir accès à des animaux dont certains gènes sont invalidés et d'autre part pour l'étude de certains comportements associés à l'alcool qui sont inobservables chez d'autres animaux.

Nous envisageons d'utiliser trois modèles différents de souris génétiquement modifiés au cours de ce projet : le choix des gènes inactivés/délétés se fera au long cours. Nous avons d'ores et déjà identifié un certain nombre de cibles moléculaires d'intérêt comme par exemple les récepteurs des systèmes dopaminergiques et histaminergiques, les récepteurs des opioïdes endogènes ou encore les récepteurs canaux au glutamate mais certaines nouvelles cibles pourront se présenter à nous au cours de ce projet. Pour chacune de ces souches génétiquement modifiée une demande d'autorisation sera déposée sur l'application DUO du Ministère en charge de la Recherche. En ce qui concerne les expériences menées sur des souches non génétiquement modifiées nous utiliserons des souris de souches différentes car certains comportements liés à l'alcool ne sont pas observables chez certaines souches. Le choix de la souche se fera en fonction du comportement d'intérêt. Pour ce qui est des traitements, nous envisageons de tester 5 molécules (nouvellement synthétisées ou nouvelle application d'une molécule déjà connue) pouvant viser les différents systèmes de neurotransmission mais également les mécanismes épigénétiques.

Le nombre total de souris nécessaire pour ce projet sera de 7860. En fonction du type d'expériences (analyses au niveau moléculaire et cellulaire  $n = 8$ , comportements stables  $n = 15$ , comportements variables  $n = 20$ ), le nombre d'individus nécessaire a été calculé dans l'optique de réduire au maximum le nombre de souris utilisées sans modifier l'interprétation des résultats.

En ce qui concerne le traitement de la douleur, une évaluation quotidienne en utilisant la Mouse Grimace Scale, permettra d'évaluer la douleur/souffrance que pourraient présenter les animaux dans les périodes hors chirurgie. Une échelle d'évaluation spécifique à la chirurgie sera utilisée durant les 5 jours qui suivent l'opération. Une gradation dans la prise en charge de la douleur/souffrance sera mise en place avec une administration de Paracétamol ou tout autre produit vétérinaire analgésique de palier 1 (Doliprane pédiatrique, 100mg/kg dans l'eau de boisson) en première intention et une injection de Buprénorphine (Buprécare 0,05 mg/kg) en cas de souffrance d'intensité plus importante.

Les animaux seront stabulés en groupe de 5 souris (sauf lors d'une expérience de consommation d'alcool en libre choix à 2 bouteilles ou les souris seront isolées de manière transitoire) dans des cages enrichies par un tube en carton, une roue d'activité et de la litière foisonnante

L'objectif de ce projet global est de comprendre les mécanismes neurobiologiques, qui sous-tendent la vulnérabilité vis-à-vis de l'alcool. L'obtention de ces données constituera une étape décisive dans la compréhension de la pathologie et l'identification de cibles thérapeutiques pertinentes.

**20074** Le terme épilepsie recouvre un groupe de maladies se caractérisant par des crises épileptiques (convulsions et perte de consciences principalement) spontanées et récurrentes. Celles-ci sont causées par une activité électrique anormale du cerveau. Les épilepsies affectent près de 70 millions de personnes dans le monde, dont presque 1% de la population infantile mondiale. Malgré la trentaine de molécules antiépileptiques (MAE) mise sur le marché, environ un quart des patients (20-30%) présente une forme d'épilepsie qui résiste à ces traitements (forme pharmaco-résistante). L'impact de l'épilepsie est donc très important que ce soit au niveau psychologique pour le patient et sa famille ou au niveau économique pour la société (coût de prise en charge élevé surtout pour les formes pharmaco-résistantes).

Parmi les hypothèses pouvant expliquer la résistance aux traitements médicamenteux, des études récentes ont mis en évidence l'altération de l'efficacité des MAE par la flore intestinale des patients. Ainsi, il a été démontré que les MAE pouvaient être dégradées par des bactéries de la flore intestinale ou que des antibiotiques pris conjointement pouvaient réduire l'efficacité de MAE. De même, il a été observé que la flore intestinale était plus variée chez les patients ayant une forme pharmaco-résistante. Enfin, les effets bénéfiques du régime cétogène (alimentation riche en graisses et pauvre en sucres), utilisé dans le cadre du traitement d'une forme particulière d'épilepsie infantile, pourraient provenir d'une action sur la flore intestinale. Ainsi, agir sur la composition de cette dernière semble être une approche prometteuse pour améliorer et/ou corriger la résistance aux traitements par MAE observée dans certaines formes d'épilepsie, notamment infantiles. Ce type d'approche a par ailleurs déjà fait ces preuves pour l'amélioration de la réponse aux thérapies anti-cancer.

L'objectif de notre projet de recherche est d'évaluer l'impact de la modification de la flore intestinale sur l'effet des MAE dans un modèle d'épilepsie induite chez le rat. Dans ce but, nous demandons une autorisation d'expérimenter d'une durée de 3 ans pour réaliser un ensemble de 3 procédures expérimentales. Nous utiliserons dans ce cadre uniquement de jeunes rats mâles et il s'agira des mêmes animaux pour les 3 procédures. La procédure 1 consiste à modifier la flore intestinale de ces rats au moyen d'un cocktail d'antibiotiques placé dans leur eau de boisson. En plus de ce traitement antibiotique, la moitié des animaux recevra, toujours dans l'eau de boisson, une MAE parmi les 4 que nous voulons évaluer. Cette procédure durera 12 jours. La procédure 2 aura lieu au 10<sup>ème</sup> jour de traitement antibiotique/MAE. Il s'agira d'implanter une électrode électroencéphalographique (EEG) sur le sommet du crâne du rat. Cette électrode est nécessaire pour enregistrer les manifestations électriques du cerveau lors de la crise épileptique que nous induirons. L'implantation de cette électrode se fait sur animal anesthésié et dure entre 30 et 45 minutes par animal. La procédure 3 permettra d'évaluer l'influence de la modification de la flore intestinale sur l'effet du traitement au MAE et aura lieu au 12<sup>ème</sup> jour de traitement antibiotique/MAE (soit 48h après la chirurgie). Pour cela, nous allons provoquer une crise d'épilepsie chez les rats traités précédemment en injectant une molécule convulsivante et antagoniste des récepteurs GABA. L'animal vigile recevra donc une injection en intrapéritonéale puis sera placé dans une arène d'enregistrement individuel. Nous enregistrerons son comportement par vidéo ainsi que l'apparition de la crise épileptique grâce à l'électrode EEG. Après 1h de suivi, l'animal sera euthanasié pour réaliser des prélèvements biologiques qui seront utilisés pour valider les résultats comportementaux et d'enregistrement EEG.

Ce projet a été pensé en accord avec la règle des 3R :

1) REMPLACER : Bien que ce projet s'inscrive dans une étude translationnelle dont une grande partie s'effectue sur des prélèvements provenant de patients ou des cultures de cellules, l'évaluation chez l'animal est une étape nécessaire. Il n'existe en effet pas de modèles basés sur l'utilisation de cultures cellulaires qui : 1) rendent compte de façon fiable de la complexité du tissu cérébral, 2) permettent d'évaluer l'effet de la modification de la flore intestinale sur l'efficacité des MAE en même

temps sur le cerveau et le système digestif, ainsi que 3) sur les manifestations comportementales d'une crise épileptique induite.

2) REDUIRE : Le nombre d'animaux que nous proposons d'utiliser dans ce projet est basé sur les prérequis statistiques nécessaires pour obtenir des réponses scientifiquement rigoureuses aux questions posées tout en tenant compte du principe de réduction. Nous utiliserons un effectif total de 120 animaux. Il correspond à 10 groupes de 12 animaux, nombre minimal par groupe permettant de réaliser des analyses statistiques scientifiquement rigoureuses et valides. Les 10 groupes correspondent à 5 traitements (un groupe contrôle et 4 MAE différentes) réalisés à chaque fois chez des animaux avec une flore intestinale soit normale soit modifiée par le cocktail d'antibiotiques.

3) RAFFINER : Nous avons pris en compte le bien-être de l'animal lors de la conception de ce projet. Ainsi, nos animaux seront hébergés en groupe dans un milieu enrichi ce qui minimisera leur stress. Nous réaliserons aussi un suivi de leur bien-être tout au long de leur vie au moyen d'une grille de scores permettant de quantifier l'apparition de stress, inconfort ou douleur. Cette évaluation nous permettra de mettre en place, si besoin, des méthodes pour améliorer leur bien-être. Son rythme quotidien peut être augmenté si des signes indiquent une diminution du bien-être. Nous avons prévu d'adapter la nourriture des rats en cas de perte de poids notable et après la chirurgie. Nous utiliserons des analgésiques en préventif lors de la procédure chirurgicale (injection sous-cutanée et application locale) et au besoin en post-opératoire (injection sous-cutanée). Enfin, la grille de score nous permet de définir des critères d'arrêt de l'expérimentation. Lorsqu'un animal atteint l'un de ses critères d'arrêt, il sera euthanasié.

**20075** L'équipe s'intéresse à un récepteur nommé CD95, qui est retrouvé à la surface de la plupart des cellules de l'organisme. Ce récepteur est capable d'induire la mort des cellules qui doivent être éliminées, par exemple quand des cellules sont infectées ou cancéreuses. Mieux comprendre le contrôle de la présence de CD95 à la surface cellulaire permettrait donc d'identifier des outils pour augmenter cette mort cellulaire quand elle est désirable.

En limitant l'activité d'une autre protéine (nommée IRE1), nous avons identifié un moyen d'augmenter la présence de CD95 à la surface des cellules, et donc d'augmenter la capacité de CD95 à induire la mort des cellules. Suite à ces premières observations sur des cellules en culture nous souhaitons avec ce projet déterminer si IRE1 peut aussi contrôler la présence de CD95 à la surface cellulaire dans un organisme (ici, évalué dans le foie de souris). Dans un second temps, nous utiliserons un anticorps qui permet d'activer artificiellement CD95, et donc d'induire la mort cellulaire qui dépend de ce récepteur. Nous évaluerons si en réduisant l'activité d'IRE1 (par un composé pharmacologique), la mort cellulaire induite par cet anticorps est augmentée. Ainsi, nous aurons défini si augmenter la mort cellulaire induite par CD95 en inhibant IRE1 est possible au sein d'un organisme entier.

Pour cela, nous utiliserons un modèle murin immunocompétent. 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 de 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 *in vitro* ne récapitule fidèlement les événements se déroulant *in vivo*. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études *in vivo* prenant en compte la complexité de l'environnement cellulaire. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochables. Au total 110 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.

**20076** Le développement de métastases péritonéales est fréquent dans les cancers digestifs et gynécologiques. La chimiothérapie et l'immunothérapie intraveineuse ont une efficacité moindre par rapport à d'autres sites métastatiques, et le pronostic vital reste très défavorable. La chirurgie est efficace mais n'est proposée qu'à une minorité de patients sélectionnés et elle ne permet pas d'éliminer toutes les métastases. Il existe à ce jour deux méthodes pour traiter in situ les métastases. La chimiothérapie intrapéritonéale hyperthermique (CHIP) et la chimiothérapie intrapéritonéale par aérosols pressurisés (PIPAC). Les études sont contradictoires quant aux bénéfices/risques des deux méthodes. Les derniers essais randomisés tendent à montrer un avantage de la PIPAC par rapport à la CHIP.

Créée en Allemagne en 2013, la PIPAC consiste à vaporiser de la chimiothérapie directement dans l'abdomen d'un patient, sous forme d'aérosol, lors d'une laparoscopie (petites incisions de l'abdomen). La technique consiste à vaporiser la chimiothérapie directement dans l'abdomen du patient sous forme d'aérosol, à la laisser en suspension dans le ventre gonflé d'air pendant trente minutes, puis à enlever l'air en circuit fermé sur un filtre spécifique. La PIPAC présente l'avantage de réduire les doses de médicament de chimiothérapie puisque seulement un dixième des doses utilisées en intraveineuse est nécessaire. Cela permet de réduire les effets secondaires comme la perte des cheveux et les douleurs digestives. De plus, cela réduit l'intervalle entre deux traitements puisque l'intervention doit être pratiquée toutes les six semaines quand la chimiothérapie par intraveineuse peut être requise tous les quinze jours. Toutefois la durée de 30 minutes de vaporisation peut conduire à des douleurs abdominales ou à des risques de déhiscence des sutures en cas d'intervention chirurgicale.

En 2016, la PIPAC a évolué : l'aérosol thérapeutique est cette fois-ci chargé puis précipité. On parle alors de ePIPAC pour « electrostatic precipitation PIPAC ». Les résultats d'expériences in-vitro et ex-vivo montrent que la ePIPAC a plusieurs avantages sur la PIPAC : elle améliore la profondeur de pénétration tissulaire du médicament, assure une meilleure homogénéité de distribution et réduit le temps opératoire.

Cependant, dans ces études cliniques, le temps d'application de la ePIPAC reste arbitraire. La précipitation de l'aérosol étant visuellement quasi-immédiate (quelques secondes), certains auteurs ont cru limiter ce temps à une minute. L'étude clinique correspondante, si elle a confirmé la tolérance et la sécurité de l'ePIPAC, n'a montré qu'une efficacité anti-tumorale décevante.

Un travail expérimental supplémentaire était donc nécessaire, mais, si l'étalonnage du temps d'application entre 1 et 30 minutes avait été fait directement sur les animaux il aurait requis de nombreux groupes et le sacrifice d'une centaine d'animaux. Pour cette raison, des expériences préliminaires ont été réalisées afin de réduire le nombre d'animaux. Afin de remplacer les études sur l'animal un modèle ex-vivo a été développé. Il s'agit de la technique de la vessie bovine inversée (inverted bovine urinary bladder, IBUB) réalisée à partir de vessies récupérées sur des animaux en abattoir.

L'absorption des médicaments aérosolisés a été mesurée en temps réel sur ce modèle. Les résultats obtenus suggèrent que le temps d'application le plus court sans perte d'efficacité est de 6 minutes. Avant de pouvoir être appliqué à l'homme, ce résultat doit encore être validé chez l'animal. En effet, le modèle IBUB n'a pas d'irrigation sanguine ce qui peut fausser les résultats *in vivo*.

Du fait de ses propriétés anatomiques similaires à l'homme, le porc apparaît être le meilleur modèle animal pour cette étude. Les porcs sont traités avec soit la technologie PIPAC soit la technologie ePIPAC, aux mêmes doses cliniques et en utilisant les mêmes outils technologiques. Il s'agira d'une expérimentation sans réveil. Les mesures pharmacologiques seront effectuées sur les échantillons prélevés.

L'hypothèse testée est que la concentration tissulaire des médicaments administrés après 6 min d'application par ePIPAC n'est pas inférieure à la concentration après 30 minutes par PIPAC. La planification biométrique a été créée sur la base des données obtenues grâce au grand nombre d'expérimentations ex vivo et a permis de limiter à 14 le nombre d'animaux nécessaire pour cette étude : un groupe test de 7 animaux traités en ePIPAC pendant 6 minutes et un groupe contrôle de 7 animaux traités en PIPAC pendant 30 minutes.



Les animaux seront logés sur copeaux, dans un milieu enrichi avec des jouets, et seront placés en groupe conformément au mode de vie social de cette espèce afin de respecter leur bien-être. Une période d'acclimatation d'au moins 7 jours sera respectée. Les visites quotidiennes visent à instaurer un sentiment de confiance en l'homme. Le bien-être des porcs en sera donc considérablement accru. Lors de l'expérimentation, l'analgésie et l'anesthésie seront réalisées sous contrôle d'un vétérinaire. Un monitoring permettant de suivre les constantes vitales de l'animal est mis en place pendant toute la durée de la chirurgie. Des points limites sont définis ainsi que des critères d'exclusion.

Outre la réduction importante du nombre d'animaux utilisés lors de cette étude, nous mettons en place plusieurs éléments afin de maximiser le bien-être et de minimiser la douleur des animaux

Un examen sanitaire des animaux sera réalisé dès leur entrée dans l'animalerie et l'évaluation du bien-être des animaux sera réalisée dans l'animalerie grâce à l'utilisation d'une grille avec un score de bien-être. Le cas échéant, des mesures correctives seront apportées.

Si l'utilisation d'un modèle animal est indispensable pour ce projet scientifique, l'ensemble des mesures mises en place dans cette étude permettent de s'assurer du bien-être des animaux et de vérifier l'absence de souffrance animale.

Les résultats, s'ils confirment l'hypothèse de travail, permettront une recommandation clinique du temps d'application de la ePIPAC, et, en théorie, permettront une amélioration de la thérapie de la carcinose péritonéale pour un total potentiel d'environ 1 million de patients/année.

**20077** L'importance des communications entre le squelette et d'autres organes comme le cerveau, le rein ou les tissus adipeux en physiopathologie ne fait aujourd'hui aucun doute. Pour autant, les mécanismes d'interaction qui régissent ces interactions sont loin d'être complètement élucidés. Notre but est de mieux comprendre ces mécanismes en portant une attention particulière sur le rôle de la protéine Slc20a2/PiT2. PiT2 est un transporteur de phosphate (Pi) présent à la surface de la plupart des cellules de mammifères. Nos travaux montrent qu'elle joue un rôle important pour la qualité et la solidité osseuse sans pour autant agir directement sur les cellules minéralisantes du squelette. Nos résultats suggèrent que des défauts de communication entre le squelette et d'autres organes pourraient influencer sur l'intégrité du tissu squelettique. Nous savons qu'il existe un lien étroit entre l'intégrité du tissu squelettique et celle du tissu adipeux présent dans la moelle osseuse (TAM, pour Tissu Adipeux Médullaire). On sait par exemple que dans des conditions de restriction calorique (cas des patients atteints d'anorexie mentale), la perte de la masse osseuse est associée à une augmentation du volume de TAM. Or, nous avons récemment identifié des anomalies de formation du TAM chez les souris invalidées totalement pour le gène Slc20a2 (Souris PiT2KO). Pour déterminer si PiT2 joue un rôle dans l'équilibre entre ces deux tissus en pathologie, nous analyserons les effets de l'absence de PiT2 sur le TAM dans un modèle de restriction calorique. Les animaux sont hébergés en cage individuelle pendant la durée de la procédure, dans des cages enrichies, sur des portoirs ventilés. Les animaux seront observés et pesés quotidiennement. Six semaines après le début de la procédure, les animaux seront mis à mort par dislocation cervicale sous anesthésie. Cette étude vise à comprendre l'implication de la protéine PiT2 dans la physiopathologie du squelette et sa communication avec le tissu adipeux de la moelle. Les analyses phénotypiques prennent en compte la règle des 3R : 1/ Remplacer : l'animal entier est aujourd'hui le seul moyen fiable pour étudier les communications entre plusieurs organes, il n'existe donc pas de méthode alternative à l'utilisation de l'animal pour ce projet, 2/ Réduire : l'étude sera réalisée sur un nombre d'animaux par groupe correspondant au nombre minimal requis afin d'atteindre une significativité statistique (soit 10 animaux femelles adultes âgées de 6 semaines par groupe), et 3/ Raffiner : les mesures prises pour limiter les conséquences de l'isolement seront un hébergement dans des cages enrichies d'un refuge en cellulose et de frisottis, sur des portoirs ventilés. Les animaux seront observés quotidiennement. L'étude du phénotype des souris PiT2KO nécessitera 40 souris sur 3 ans.

**20078** Le contexte actuel encourage les éleveurs, à faire évoluer leur système d'élevage en intégrant les concepts d'agroécologie. Cela implique d'optimiser les rations des ruminants en conciliant les objectifs d'efficacité alimentaire, de qualité du lait, de bien-être, de santé animale et de maîtrise des impacts pour l'environnement tout en anticipant les possibles problèmes liés aux évolutions climatiques.

Pour proposer des outils caractérisant à la fois la valeur des régimes alimentaires et les réponses des animaux (en termes de croissance, production de lait mais aussi de santé), il faut pouvoir quantifier les flux digestifs ainsi que les transformations des aliments en nutriments absorbés. Ces nutriments sont alors utilisés par l'organisme pour les différentes fonctions (immunitaire, croissance, lactation). Pour y parvenir, il faut pouvoir à la fois quantifier les nutriments absorbés lors de la digestion ainsi que leurs effets sur la qualité du lait, le maintien de l'état corporel, la croissance et, la santé des animaux. Or, les ruminants se distinguent des espèces monogastriques par la présence en amont de la caillette (assimilable à l'estomac) d'un rumen, immense bio-fermenteur représentant 70 % du volume du tube digestif et contenant plusieurs milliards de bactéries, protozoaires et champignons. Ces micro-organismes digèrent une partie des aliments, ce qui génère une composition de nutriments absorbables très spécifique aux ruminants et difficiles à mesurer. En effet, les nutriments énergétiques principalement absorbés ne sont pas le glucose intestinal, comme chez les monogastriques, mais les acides gras volatils issus de la fermentation microbienne de l'amidon dans le rumen. De plus, la moitié des protéines digérées sont issues des synthèses microbiennes dans le rumen, l'autre moitié provenant des aliments. Cette particularité digestive conduit à une prévision difficile de la valeur des aliments, en particulier des flux de nutriments absorbés. Ainsi, pour étudier l'effet de certains nutriments sur le métabolisme et l'impact sur la qualité du lait, on ne peut pas toujours simplement donner le nutriment dans l'alimentation des ruminants car ce nutriment est en partie transformé en un autre nutriment lors de la digestion microbienne dans le rumen. Il faut donc s'adapter à ces particularités digestives pour pouvoir les étudier et certains nutriments doivent donc parfois être apportés directement dans le rumen (acides gras volatils, certaines vitamines) ou après le rumen (acides aminés, minéraux, certaines vitamines, glucose, etc.). Ainsi, pour quantifier les flux de ces nutriments (ou pour contrôler leur apport) et comprendre leurs effets sur le métabolisme de l'animal, il est important de pouvoir prélever ou perfuser ces nutriments dans les différents compartiments digestifs (rumen ou après le rumen dans la caillette ou le duodénum).

Ces études sur les effets sur la qualité du lait, le maintien de l'état corporel, la croissance et la santé des vaches, ne peuvent se faire que sur des animaux vivants et ne peuvent pas être remplacées par des études *in vitro*. Cependant dans le cadre de l'application du principe des 3R (remplacement et raffinement), nous souhaitons développer deux méthodes alternatives à la pose de canules permanentes (sur plusieurs années) au niveau du duodénum (intestin grêle). Ces méthodes seront testées sur 8 vaches laitières.

La première méthode alternative qui fait l'objet de cette demande doit permettre la perfusion contrôlée de nutriments après le rumen (acide aminés, minéraux, certaines vitamines, glucose etc.) pendant un essai de quelques semaines. Il s'agit d'éviter la pose de canules duodénales permanentes sous anesthésie générale accompagnée d'une analgésie. Dans un objectif de raffinement, il est proposé de tester une technique de pose d'un petit cathéter de perfusion de nutriments dans la caillette sous anesthésie locale et analgésie sur 3 vaches. Les vaches porteuses d'un cathéter de la caillette recevront ensuite une perfusion de nutriments dans la caillette sur 8 semaines pour vérifier la fonctionnalité du système sur une durée comparable à ce type d'essai de nutrition. Des prises de sangs seront alors effectuées pour permettre d'attester de la bonne absorption des nutriments perfusés. En fin d'essai, le cathéter sera obturé et placé en sous-cutané.

La seconde méthode alternative serait de mettre au point une technique de pose de canules temporaires du duodénum afin de pouvoir quantifier les flux de nutriments absorbés dans des études de digestion. Dans cette demande, il est proposé de tester dans une première étape, une technique de retrait de la canule duodénale sous anesthésie locale et analgésie sur 5 vaches actuellement porteuses d'une canule de ce type.

Pour ces deux actes, un suivi multiparamétrique (observation du comportement et mesure d'indicateurs sanguins) permettra d'apprécier la bonne prise en charge de la douleur opératoire et post-opératoire des vaches par le protocole d'anesthésie et d'analgésie. Pour ces deux actes, le nombre d'animaux (3 et 5) a été raisonné pour rester faible mais comparable au nombre d'animaux utilisés dans ce type d'essai (3 à 6). Il est à souligner que les techniques envisagées sont couramment pratiquées en médecine vétérinaire.

**20079** Selon le cadrage national, un parcours en Licence dans le domaine de la Biologie doit être délivré suite notamment à un enseignement théorique et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions chez le mammifère et chez l'homme. L'acquisition des compétences requises nécessite donc un enseignement pratique notamment dédié à l'expérimentation animale afin d'illustrer les concepts majeurs de la physiologie en conditions concrètes et réelles par l'application d'une méthodologie de type recherche scientifique en biologie. Au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, les objectifs d'une licence en Biologie correspondent à la poursuite d'études dans des masters du domaine de la biologie et de la santé impliquant une insertion professionnelle dans des laboratoires de recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et des laboratoires de recherche académique qui nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. En conséquence, l'enregistrement de paramètres biologiques, une sensibilisation à l'expérimentation animale et la mise en évidence de régulations hormonales ainsi que d'activités pharmacologiques sont nécessaires pour instruire et former les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle molécule candidat-médicament. Seuls les étudiants choisissant spécifiquement un parcours dédié seront intégrés à ce projet. Ce projet permettra aux étudiants, après une séance de sensibilisation à l'expérimentation animale et une chirurgie réalisée par un enseignant habilité et expérimenté, de mettre en place des protocoles expérimentaux sous la forme de projets encadrés. Le contexte scientifique est de mesurer et quantifier par la technique d'organe isolé l'impact d'hormones stéroïdiennes (œstradiol et progestérone) sur la réponse contractile de l'utérus de ratte à des substances pharmacologiques utilisées dans la pharmacopée humaine (contracturants ou relaxants).

La règle des 3R établie par Russel et Burch a été prise en compte.

Remplacer: Compte tenu des exigences du programme pédagogique universitaire national, le recours à des modèles animaux est incontournable et il ne nous est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par d'autres alternatives *in vitro* ou *in silico*.

Réduire: Les protocoles expérimentaux sont mis en place de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Ainsi, il est prévu de n'utiliser que 4 rattes par groupe de 20 étudiants lors de 2 séances successives de travaux pratiques. Comme 8 groupes d'étudiants sont programmés par an, un maximum de 32 rattes par année universitaire sera utilisé soit un maximum de 160 rattes sur 5 ans. Ce nombre est un compromis nécessaire pour répondre aux exigences de la formation en termes d'observation et de pratique technique en accord avec les obligations pédagogiques relatives au diplôme et pour satisfaire au critère de réduction du nombre des animaux en vigueur dans la règle des 3R. Le nombre de rattes utilisées se base donc sur le précédent projet validé et a été réduit à une seule ratte par traitement hormonal et par séance (2 traitements différents seront étudiés sur 2 séances soit 4 rattes). Ce projet a donc vu une réduction importante du nombre de rattes utilisées (4 au lieu de 6 rattes / groupe d'étudiants).

Raffiner: Les données recueillies lors de la précédente maquette d'enseignement ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales, notamment pour la définition de points de contrôle et limites (comportementaux et physiques). De plus, les conditions opératoires lors de l'ovariectomie ont été optimisées par l'utilisation d'un tapis chauffant, de conditions d'asepsie strictes, d'antalgiques locaux et centraux et d'anti-inflammatoires en péri- et post-opératoire. Des grilles de suivi péri- et post-opératoires plus complètes et détaillées ont été mises en place. Enfin, le raffinement des conditions d'hébergement des animaux a également été amélioré et, dans la

mesure du possible, nous utiliserons les animaux de réforme disponibles chez les fournisseurs agréés.

**20080** 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. Il existe un modèle de souris qui reproduit le phénotype de la myopathie centronucléaire liée à l'X avec des caractéristiques classiques comme un défaut de localisation des noyaux dans les cellules musculaires et une atrophie musculaire, associées à une faiblesse musculaire progressive, conduisant à la mort entre 3 et 12 semaines. Il a été montré précédemment qu'un niveau trop élevé d'une certaine protéine dans le muscle semblait jouer un rôle majeur dans la survenue de certaines myopathies. Une approche thérapeutique utilisant un composé injectable capable aussi de diminuer le niveau de cette protéine a été utilisée. Le rétablissement quasi 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 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.

**REMPACEMENT** : 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 tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures.

**REDUCTION** : Certains groupes expérimentaux de souris seront communs aux différentes cohortes afin d'éviter la répétition pour réduire le nombre total de souris.

**RAFFINEMENT** : 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude, sauf pour le groupe de souris Mtm1 knockout traitées avec le contrôle où 30 souris seront nécessaires. En effet, les souris Mtm1 KO ne survivent pas toujours jusqu'à 5 semaines et la quantité de sang récupérée par souris est très faible, ainsi pour avoir l'équivalent de 15 souris dans ce groupe statistique il nous en faut 30 dans le groupe expérimental. Un maximum de 210 souris sera utilisé pour les groupes expérimentaux et un maximum de 414 souris sera utilisé pour le maintien de la lignée, soit un total de 624 souris. Une surveillance quotidienne permettra de repérer précocement les signes de souffrance/douleur/stress. Dès l'apparition de ces signes un suivi sera effectué via une fiche scoring pour définir les points limites permettant de prendre les mesures appropriées en fonction du niveau observé, limitant ainsi la souffrance de l'animal. 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 (eg. de la nourriture en gel placée dans la cage pour les souris malades à la place des croquettes sur la grille).

**20081** Le vieillissement est un processus complexe modulé par des facteurs environnementaux et génétiques. Chez l'Homme, des mutations dans certains gènes provoquent des syndromes de vieillissement prématuré, et de la sénescence cellulaire. Diverses voies génétiques ont été identifiées, montrant une forte corrélation avec la longévité, à la fois chez l'Homme et dans des modèles murins.

Nous avons démontré *in vitro* que la sénescence cellulaire pouvait être inversée grâce à une stratégie de reprogrammation. Il semble possible de surmonter les barrières liées à l'âge, et de ralentir le processus de vieillissement en manipulant le destin des cellules pour améliorer la régénération des tissus.

Nous travaillons sur un projet basé sur cette connaissance pour étudier l'impact de la reprogrammation dans la régénération tissulaire. Pour cela, nous utilisons un modèle murin atteint d'une pathologie de vieillissement accéléré récapitulant le syndrome humain de Hutchinson-Gilford encore appelé Progeria. Cette maladie rarissime est caractérisée par un vieillissement prématuré débutant dès la période néonatale. L'espérance de vie des patients atteints de progeria est très limitée : 13 ans en moyenne. Ce modèle murin Progeria est croisé avec un autre qui est génétiquement modifié afin de pouvoir induire une reprogrammation cellulaire transitoire *in vivo* et améliorer l'état de santé et la durée de vie. Nous avons déjà montré qu'une reprogrammation transitoire *in vivo* induite précocément (animaux jeunes à 2 mois) permet un allongement de l'espérance de vie sur des âges tardifs et une amélioration de l'intégrité cellulaire et tissulaire au cours du vieillissement. Notre hypothèse est que l'ensemble de ces effets positifs serait optimisé avec une reprogrammation transitoire *in vivo* induite tardivement (animaux âgés à 6 mois).

Ce projet propose donc de suivre l'impact d'une reprogrammation transitoire *in vivo* induite tardivement. Nous évaluerons cet impact sur la longévité des animaux et sur leur état de santé global grâce à des analyses sanguines et tissulaires.

Pour cette étude, nous prévoyons d'utiliser 56 souris génétiquement modifiées.

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

- "Remplacer" les modèles animaux :

Nous avons déjà démontré *in vitro* que la sénescence cellulaire pouvait être inversée grâce à une stratégie de reprogrammation. Pour avancer, ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle *in vitro* n'est capable de représenter la complexité de l'ensemble des mécanismes physiologiques et de métabolisme. Aussi, dans le cadre de ce projet, une étude sur l'organisme entier est nécessaire.

- "Réduire" le nombre d'animaux en expérimentation :

Afin d'optimiser au mieux l'utilisation de tous les animaux produits, nous allons réaliser nos tests à la fois sur les mâles et les femelles.

Le nombre d'animaux par groupe est fixé à 4 pour les prélèvements tissulaires et à 10 pour l'étude de la longévité. Ces nombres ont été définis d'après des analyses statistiques comme nécessaires et suffisants pour obtenir des résultats statistiquement significatifs qui nous permettront de conclure. Du fait de la variabilité liée au sexe, il est nécessaire de constituer des groupes de mâles et de femelles.

- "Raffiner" la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") :

Aucun dommage, hormis ceux liés au vieillissement naturel des animaux, n'est attendu au cours de ce projet. Les procédures expérimentales étant non invasives, l'utilisation d'analgésiques ne sera pas nécessaire. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien afin de prendre les mesures évitant toute souffrance éventuelle.

Ces souris présentent un phénotype de vieillissement accéléré (espérance de vie moyenne 40 semaines pour les hétérozygotes). L'examen journalier des souris sera effectué pour détecter et renseigner dans des fiches de suivi individuelles les premiers signes comportementaux de la douleur ou d'éventuelles anomalies (isolement, absence de mobilité, perte d'appétit, hérissure des poils, dos voûté...). L'état de santé des animaux sera évalué par les tests de réflexe du retournement et de la capacité d'agrippement qui constitueront un point limite entraînant la mise à mort de l'animal.

Dès les premiers signes de difficultés de déplacement ou de nutrition, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages.

**20082** Le tissu osseux est un tissu vivant minéralisé très complexe remodelé en permanence, en masse et en architecture, pour s'adapter à la croissance, au vieillissement et aux contraintes mécaniques. Le remodelage osseux est assuré par un mécanisme complexe où interviennent à la fois des mécanismes hormonaux (hormone parathyroïdienne, calcitonine, œstrogènes, etc.), des signaux provenant du microenvironnement osseux (RANKL, TNF- $\alpha$ , etc.) et des facteurs biomécaniques. Une altération de la réponse à ces signaux conduit au développement de maladies osseuses fragilisantes telle que l'ostéoporose en réduisant la résistance mécanique et en entraînant un risque accru de fracture.

Les stratégies thérapeutiques disponibles actuellement dans le traitement des ostéoporoses présentent certaines restrictions d'usage ou ne sont pas efficaces sur l'ensemble des sites fracturaires. De nouvelles solutions thérapeutiques sont clairement requises.

Une régulation du remodelage osseux par le système gastro-intestinal est suspectée. En effet les récepteurs à certaines hormones intestinales sont exprimés par les cellules osseuses et les souris déficientes en certains de ces récepteurs présentent des altérations de la qualité osseuse avec une diminution de la minéralisation et de la réticulation du collagène conduisant à une fragilité osseuse accrue. De même, l'administration d'analogues stables de ces hormones intestinales chez le rongeur non ostéoporotique ou diabétique augmente la minéralisation et la réticulation du collagène.

Les buts de ce projet de recherche sont de valider *in vivo* le design et l'efficacité d'analogues stables des hormones intestinales sur la qualité et la résistance osseuse dans des modèles d'ostéoporose (carence en oestrogènes – souris femelles âgées de 16 semaines, corticothérapie prolongée et immobilisation – souris mâles âgées de 12 semaines) chez la souris. Les résultats escomptés sont de montrer la supériorité de tels traitements comparés aux thérapies actuelles.

Ce type de projet requiert une étape de validation de ces analogues *in vivo* avant une possible utilisation chez l'homme et nécessite l'utilisation de modèles animaux d'ostéoporoses ne pouvant être remplacés par d'autres tests. Un total de 360 animaux, répartis en 30 lots, est requis pour conduire à bien ce projet. Ce nombre d'animaux a été déterminé après analyse statistique de l'échantillonnage à partir de données obtenues préalablement et constitue le plus petit nombre d'animaux permettant d'aboutir à des résultats significativement exploitables scientifiquement. Une grille de point limite a été mise en place pour réduire les souffrances des animaux survenant pendant le déroulement du projet. Les animaux seront hébergés selon les standards prévus par la réglementation, en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée.

**20083** La stéatohépatite non-alcoolique est une maladie du foie chronique en progression constante dans les pays occidentaux, avec environ 550 000 personnes diagnostiquées par an. Les patients ayant une stéatohépatite présentent une accumulation anormale de graisse dans le foie, qui s'accompagne d'un phénomène inflammatoire. Cette pathologie peut se compliquer d'une fibrose (une accumulation anormale de protéine dans le foie) pouvant entraîner une cirrhose (une étape plus grave de la fibrose où le foie ne fonctionne plus correctement) voire une tumeur maligne du foie. La seule manière fiable de diagnostiquer la stéatohépatite est actuellement la biopsie.

Le but de ce projet de recherche est de développer et valider des marqueurs non-invasifs, notamment d'imagerie, capables de remplacer la biopsie chez le patient. Cette validation est menée en parallèle d'une intervention thérapeutique, pour déterminer si nos marqueurs d'imagerie sont assez sensibles pour détecter les variations de caractéristiques tissulaires et fonctionnelles occasionnées par une régression de la pathologie d'intérêt. Ainsi validée, l'approche pourrait être proposée aux patients avec stéatohépatite sous traitement pour évaluer l'efficacité de leur traitement.

Nous utiliserons deux modèles animaux induisant de la stéatohépatite chez la souris, l'un par régime simple, l'autre par régime et injections hebdomadaires intrapéritonéales sous anesthésie légère d'un agent capable d'augmenter l'inflammation hépatique. Certains groupes d'animaux auront un arrêt de ce régime et seront remis sous régime normal : ceci représente notre intervention thérapeutique. En effet, la première mesure prise chez les patients atteints de stéatohépatite est

une modification des habitudes alimentaires. Ces modèles sont administrés sur 16 semaines au maximum, et occasionnent des degrés de surcharge en graisse, inflammation et fibrose différents. Ils ont également une vitesse de progression différente. Une étude histologique (c'est-à-dire une analyse du tissu du foie par microscopie) sera d'abord menée où les animaux seront soumis à l'un des deux régimes induisant de la stéatohépatite puis euthanasiés à différents temps pour prélèvements tissulaires : certains à un temps précoce de la maladie (après 10-12 semaines de régime, n = 8 par régime soit 16 souris) ou tardif (à 16 semaines de régime, n = 8 par régime soit 16 souris), certains après une interruption de régime à un temps précoce puis retour sous régime normal pour une semaine (n = 8 par régime soit 16 souris) ou 4 semaines (n = 8 par régime soit 16 souris), certains après une interruption de régime à un temps tardif puis retour sous régime normal pour une semaine (n = 8 par régime soit 16 souris) ou 4 semaines (n = 8 par régime soit 16 souris). 16 souris sous régime standard accompagneront ces animaux. L'étude histologique regroupe donc 112 souris. Le régime donnant une stéatohépatite bien caractérisée avant arrêt du régime, puis une régression graduelle sur 4 semaines sera choisie pour l'étude complète d'imagerie. Pour cette étude, chaque animal sera soumis à une session d'IRM sans agent de contraste puis, 24 h au minimum plus tard, à une session d'échographie avec agent de contraste, puis mis à jeun et euthanasié sous anesthésie et analgésie pour prélèvements sanguins et tissulaires. Plusieurs paramètres d'imagerie seront mesurés, permettant d'évaluer dans le foie la quantité de fibrose, la quantité de graisse, la présence d'inflammation, la souffrance des cellules et la façon dont le foie est irrigué par le sang. Ces sessions se dérouleront quand la maladie sera établie (n = 20), et après une (n = 20) et 4 semaines (n = 20) de retour sur régime normal. Nous étudierons également un groupe sous régime occasionnant une accumulation anormale de graisse mais sans inflammation (n = 15 aux mêmes 3 temps soit 45 souris), pour différencier les effets de l'inflammation et de la surcharge en graisse sur les marqueurs d'imagerie, et un groupe sous régime normal (n = 15 aux mêmes 3 temps soit 45 souris). Cette étude d'imagerie compte donc 150 souris. A la fin de chaque étude (histologique et d'imagerie), les animaux seront euthanasiés pour prélèvements sanguins et tissulaires. Au total, 262 souris seront utilisées au cours de ce projet de 2 ans.

En concordance avec la règle des 3R : les modèles de stéatohépatite induits par régime chez la souris permettent d'étudier les interactions entre le foie et les autres contingents lipidiques, ce qui n'est possible de faire qu'en étude corps entier et donc avec un modèle animal. Le nombre d'animaux par groupe a été choisi pour respecter les tests statistiques. L'imagerie multiparamétrique et multimodale réalisée sur les animaux permettra de mesurer de nombreux paramètres caractérisant de multiples facettes de la stéatohépatite. Les échantillons tissulaires et sanguins récupérés en fin d'expérience seront distribués et analysés par de nombreux laboratoires ou gardés en biobanque pour maximiser l'utilisation des animaux. De plus, les techniques d'imagerie sont connues. Les régimes utilisés ainsi que les sessions d'imagerie réalisées sous anesthésie et avec monitoring constant n'occasionnent aucune douleur ou angoisse chez les animaux. Une observation quotidienne sera réalisée, ainsi qu'un suivi clinique (une ou 3 fois par semaine selon le modèle) à l'aide d'une grille de score avec la mise en place de points limites généraux et spécifiques. S'ils sont atteints, l'animal sera euthanasié.

**20084** Selon des chiffres de l'INSERM, la douleur est à l'origine de deux consultations médicales sur trois. 30% des adultes vivent avec des douleurs chroniques. La douleur a de nombreuses conséquences sur la vie des personnes affectées : risques de développement de douleurs chroniques, association avec des troubles anxieux ou dépressifs, altérations de la qualité de vie, etc. La douleur a été étudiée sur une variété importante de modèles animaux et la quasi-totalité des antalgiques disponibles actuellement sur le marché ont été testés dans des modèles précliniques chez le rongeur. Ces modèles tendent à mimer des conditions douloureuses décrites chez l'humain, en induisant maladies ou blessures traumatiques, fournissant ainsi des systèmes intégrés utiles à l'étude de situations douloureuses diverses. Si les animaux sont incapables d'auto-évaluation, leurs comportements en réponse à des stimuli nociceptifs peuvent être étudiés de façon fiable et objectivement quantifiés (dimension sensori-discriminative de la douleur).

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet antialloodynique de candidat médicaments à l'aide de monofilaments de Von Frey dans différents modèles de douleurs aigus et chroniques. Ces filaments très fins et non douloureux pour une personne / un animal sain le devient en cas d'atteinte des nerfs lors de diabète, de traitement par chimiothérapie ou encore des neuropathies dites traumatiques mais aussi en cas d'arthrose etc.

Au sein de ce projet, les activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. L'objectif de ce projet étant le développement de modèles permettant de tester l'efficacité de candidats médicaments analgésique, remplacer l'utilisation d'animaux par des modèles *in silico* et *in vitro* permettrait seulement d'étudier les effets de ces molécules sur la nociception, c'est-à-dire les mécanismes biologiques encodant les stimuli endommageant, ou susceptibles d'endommager les tissus. Selon sa définition par IASP, la douleur est une « expérience sensorielle et émotionnelle » (<https://www.iasp-pain.org/terminology>). L'étude de potentiels traitements analgésiques doit donc être conduite dans des modèles restituant à la fois la composante sensorielle et émotionnelle et permettant l'analyse du comportement en plus de la physiologie ; faute de quoi c'est la nociception et non la douleur qui est étudiée. L'étude des candidats médicaments analgésiques chez l'animal vigile reste la seule option pour démontrer l'efficacité sur la douleur avant le passage chez l'homme.

Les modèles *in vivo* utilisés sont également raffinés pour se rapprocher au mieux des situations cliniques (induction de pathologies, mesures des composantes multiples de la douleur). Le raffinement passe également par la réduction autant que possible de la souffrance et du stress des animaux et l'amélioration de leur bien-être (enrichissement, suivi quotidien des animaux et paramètres environnementaux contrôlés tout au long de l'étude). Dans le cadre de ce projet les modèles utilisés sont de grade sévère. Des points limites pour chaque modèle sont définis comme critère d'arrêt de la souffrance.

Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre de rat utilisé pour cela est estimé à 3261 animaux sur 3 ans (1087 par an) répartis dans les 13 procédures.

**20085** Le cancer du pancréas est un cancer qui est diagnostiqué tardivement et qui présente un fort potentiel pro-thrombotique. En cas de blessure, les cellules constitutives du vaisseau sanguin (les cellules endothéliales) sont activées et permettent de recruter des neutrophiles (une sous classe de globules blancs). Ces neutrophiles sont indispensables à la formation d'un caillot plaquettaire (agrégation de cellules anucléés permettant le colmatage du vaisseau). Il a récemment été démontré que les neutrophiles sont identifiables en deux sous classe N1 et N2. La classe N1 est majoritaire dans la population humaine et murine saine. La classe N2 quant à elle, augmente dans le cas de cancer du pancréas.

L'objectif de ce travail est de démontrer que les neutrophiles initiateurs de la thrombose sont les neutrophiles minoritaire N2, que l'augmentation de la classe de N2 est à l'origine de l'augmentation de risque de thrombose associée au cancer. Nous évaluerons également le rôle du P2RY12 porté par les cellules cancéreuses dans la progression tumorale et le développement de la thrombose notamment par l'étude des interactions des cellules cancéreuses et ou des microvésicules issues de ces cellules cancéreuses avec les neutrophiles initiateurs de l'immuno-thrombose.

Pour mener à bien notre projet nous purifierons identifierons et phénotyperons ces neutrophiles N2 dans les modèles pré clinique murin orthotopique et ectopique de cancer du pancréas. Puis nous comparerons le rôle des neutrophiles N1 et N2 à partir de souris sauvages ou n'exprimant pas le récepteur à la P2RY12 dans l'immuno-thrombose en utilisant deux modèles : le modèle de blessure au laser et un modèle d'obstruction de la veine inferieure cave.

La totalité de ce projet nécessitera l'utilisation de 241 animaux Wild type et de 277 animaux P2Y12 KO.



Remplacement : Aucune lignée cellulaire immortalisée ne permet d'étudier le comportement de neutrophiles dans un contexte tumoral. Il n'est pas possible de reproduire à l'heure actuelle l'intégrité du vaisseau ni l'activation des cellules endothéliales *in vitro*.

Réduction : plusieurs stratégies seront étudiées dans la première phase, une stratégie orthotopique (cellules cancéreuses du pancréas dans le pancréas), une stratégie ectopique (implantation de cellules cancéreuses dans le flan de l'animal). Ces deux stratégies seront comparées à une stratégie *in vitro*. Nous ne reproduirons les résultats que pour le groupe présentant les meilleurs taux de N2 pour les tester sur les modèles d'immuno-thrombose.

Raffinement : les animaux sont hébergés en groupes de 5, en présence de coton de nidification ; avec boisson et nourriture ad libitum. Une période de 7 jours d'acclimatation sera réalisée pour tous les animaux avant expérimentation. Les animaux sont suivis et pesés quotidiennement après implantations (ectopique et orthotopique). Les implantations sont réalisées sous anesthésie accompagné d'analgésique. Les animaux sont observés toutes les 12 heures durant les 48 premières heures suivant les implantations, en cas de signe de souffrance les animaux seront administrés avec de la buprénorphine. La souffrance est évaluée grâce à une grille de score adaptée pour chacune des procédures d'implantation. Si nous arrivons à reproduire le phénotype des neutrophiles N2 *in vitro* nous privilégierons cette technique. En ce qui concerne les expériences d'immuno-thrombose : le modèle au laser est une expérience sans réveil réalisées sous anesthésie, les animaux seront euthanasiés par un excès d'anesthésique. Dans le cas du modèle de DVT, les animaux sont pendant toute la durée de l'expérience jusqu'à 48 heures sous buprénorphine et sont euthanasiés par dislocation des cervicales sous anesthésie volatile.

**20086** Une greffe consiste à remplacer un organe ou un tissu malade par son équivalent sain provenant d'un donneur sain. Lorsque les cellules du donneur (le greffon) attaquent les cellules du patient (l'hôte), on parle de « maladie du greffon contre l'hôte » ou de GVHD, d'après son acronyme anglais. Cette maladie est une complication majeure en transplantation qui provoque le rejet de la greffe voire la mort de patient receveur.

La GVHD peut être légère, modérée ou grave. Actuellement en clinique il existe des traitements tels que des immunosuppresseurs, mais certains patients pourraient ne pas répondre aux traitements. Sur le plan immunologique, cette maladie est provoquée par les lymphocytes T contenant dans le greffon. Des anticorps monoclonaux ciblent un récepteur membranaire exprimé sur ces lymphocytes T humains ont été développés. Ce récepteur « cible » est un marqueur des lymphocytes T activées et son niveau d'expression est associé aux états inflammatoires. Plusieurs études *in vitro* d'affinité ont permis de sélectionner 3 candidats médicamenteux (anticorps monoclonaux), mais des tests *in vivo* sont nécessaires afin de sélectionner le meilleur et de valider par la suite le mécanisme d'action dans un organisme vivant.

Dans le but d'envisager des essais cliniques chez l'homme par la suite, ces études précliniques sont indispensables. Nous devons donc tester ces anticorps monoclonaux dans un modèle *in vivo*.

Un modèle de xenoGvHD a été développé, il consiste à induire la maladie par une injection des cellules mononuclées de sang périphérique xéno-réactives (PBMCs) dans des souris immunodéficientes NSG irradiées (souris humanisées).

L'objectif de la saisine est l'évaluation du potentiel thérapeutique des anticorps monoclonaux dans un modèle de GvHD chez la souris humanisée dans le but de sélectionner le meilleur candidat qui peut atténuer ou même supprimer cette réaction indésirable.

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

- Remplacer : des études fonctionnelles ont été réalisées *in vitro* sur plusieurs lignées ainsi que sur les cellules humaines primaires ; les résultats sont prometteurs mais sont limités par l'absence du contexte physiologique. La complexité du système immunitaire ne peut pas être assurée que par des études sur un organisme vivant. Il est donc nécessaire de tester l'efficacité immuno-régulatrice de ces molécules dans un modèle *in vivo* proche de l'Homme. Le modèle de souris dites « humanisées » est une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique.

- Réduire : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à 30, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiques. Les animaux seront répartis en 5 groupes (30 souris/groupe). Le groupe témoin recevra un isotype contrôle ou PBS. Les animaux des autres groupes recevront les anticorps test et/ou des molécules commerciales afin de tester des combinaisons synergiques intéressantes ou comparer les effets.

Le nombre total des animaux est de 150. Le nombre de groupes a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial ou montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement seront euthanasiés. Afin de réduire la douleur et la souffrance et assurer le bien-être animal, des prélèvements sanguins seront effectués sur des animaux anesthésiés par inhalation de l'isoflurane (1-5%/l d'air). Les souris seront réparties par groupe de 5 par cage, avec des moyen d'enrichissement (frisottis et tunnel ou dôme).

Les animaux seront suivis pour leur poids et le score clinique de la maladie durant toute la période expérimentale. Des prélèvements sanguins seront également effectués une fois par semaine pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG.

Au sacrifice (soit au point limite ou à la fin de l'expérience), les organes seront prélevés et analysés afin d'en obtenir un maximum d'information sur la maladie et le mécanisme d'action des anticorps test. La rate sera prélevée pour effectuer une analyse immunologique par cytométrie en flux, le sérum pour doser les cytokines. La peau, foie, poumon, intestin grêles et le colon pour une étude anatomopathologique.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des anticorps testés sur les réponses immunes dans le contexte de la GVHD, et de mieux comprendre le mécanisme d'action.

**20087** Le cancer est une des pathologies dont le nombre de cas est aujourd'hui un des plus élevés dans le monde ; une des principales causes de développement de tumeur est notamment la non-reconnaissance ou la reconnaissance tardive des cellules cancéreuses par le système immunitaire (système de défense de l'organisme). Notre projet doit permettre de mieux comprendre les mécanismes de l'évasion tumorale grâce à l'étude des mécanismes mis en jeu lors de la tolérance immunitaire. En effet, le système immunitaire est éduqué pour ne pas reconnaître les cellules de l'organisme (tolérance au soi) et reconnaître spécifiquement les molécules étrangères (dérivés des microbes ou des cellules cancéreuses) afin de déclencher une réponse permettant leur élimination. Pour mener à bien ce projet qui durera cinq ans, nous utiliserons 6 lignées de souris génétiquement modifiées. Les modifications génétiques présentes chez ces souris n'entraînent aucun effet sur leur bien-être. Ce projet se déroulera en trois étapes. Tout d'abord nous réaliserons une caractérisation des cellules du système immunitaire présentes dans le sang périphérique (obtenu par prélèvement au niveau de la veine faciale sur souris éveillée, procédure non douloureuse) et dans différents organes (obtenus après euthanasie) de ces différentes lignées de souris. Puis, grâce à la mise en place d'un modèle expérimental, nous pourrions étudier finement les mécanismes de tolérance. Ce modèle consiste à induire une réponse immunitaire après injection par voie intra-veineuse (injection non douloureuse dans la veine de la queue de souris éveillée) de cellules du système immunitaire spécifiques d'une molécule considérée comme étrangère et à suivre le développement possible de phénomènes auto-immuns (mise en place de réponses du système immunitaire dirigées contre l'organisme, caractérisées par une diminution du nombre de globules rouges et/ou une augmentation du volume de la rate). Les cellules immunitaires spécifiques de la molécule étrangère sont obtenues par une immunisation de souris, c'est-à-dire l'injection par voie sous-cutanée (sous la peau du dos) de la molécule étrangère qui est non toxique pour l'animal. Après ces étapes d'analyse des réponses immunitaires dans un contexte non tumoral, nous testerons 2 molécules pour leur capacité à modifier les réponses immunitaires vis-à-vis des cellules cancéreuses. Pour cela, des cellules tumorales de souris seront injectées sous la peau (au niveau du flanc, injection non douloureuse réalisée sur souris éveillée), 6h avant le début du traitement administré par voie

intra-veineuse (tous les jours pendant 9 jours). Le développement de la tumeur restera localisé au site d'injection (développement d'une boule sous la peau dont la croissance sera suivie quotidiennement et mesurée une fois par semaine). Deux jours après, les souris recevront également, par voie intra-veineuse, des cellules du système immunitaire capables de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales.

Tout au long du projet, nous veillerons à appliquer la règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner). Remplacement : nous avons réalisé le maximum d'expériences *in vitro*. Néanmoins, l'utilisation d'un modèle animal est indispensable pour continuer ce projet de recherche. En effet, seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans sa globalité la réponse immunitaire avec les interactions entre les différents types de cellules et l'effet des traitements.

Réduction : nous nous attacherons à limiter au minimum le nombre de souris utilisées tout en assurant l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Pour les étapes de caractérisation des mécanismes de tolérance dans nos différents modèles de souris, nous utiliserons 1950 souris. Ce nombre prend en compte : (1) 50 souris pour la caractérisation des cellules du système immunitaire présentes dans 5 de nos lignées transgéniques (5 lignées x 5 souris/lignée x 2 expériences indépendantes). (2) 300 souris pour générer les cellules immunitaires spécifiques de la molécule reconnue comme étrangère par le système immunitaire (4 lignées x 3 conditions d'immunisation x 5 souris/groupe x 5 expériences indépendantes). (3) Et 1600 souris pour les expériences d'analyse des mécanismes de tolérance. Deux procédures indépendantes seront réalisées utilisant soit 3 soit 7 lignées de souris, incluant une lignée de souris contrôle. Ainsi nous utiliserons 700 souris (7 lignées x 4 types de cellules du système immunitaire x 5 souris/groupe x 5 expériences indépendantes) et 900 souris (3 lignées x 12 types de cellules du système immunitaire x 5 souris/groupe x 5 expériences indépendantes) Pour l'étude de l'effet des deux molécules sur la reconnaissance des cellules tumorales, nous utiliserons 500 souris (5 types de cellules tumorales x 2 molécules x 2 doses x 5 souris /groupes x 5 expériences indépendantes). Au total, 2450 souris seront nécessaires sur les 5 ans que durera le projet.

Raffinement : Une attention toute particulière sera portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément à celle des expérimentateurs. Chaque semaine, une grille d'évaluation des signes cliniques sera renseignée (aspect des souris, comportement, blessures, poids) et les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique seront euthanasiées. Les souris seront placées dans des cages avec des enrichissements (rouleaux en carton, coton, buchettes de bois...) qui leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels.

L'ensemble des animaux inclus dans ce projet sera euthanasié en fin de procédure (au plus tard 12 semaines après le début du protocole).

**20088** L'objectif de ce projet est d'évaluer les conséquences, sur le développement cérébral à court, moyen et long terme, d'une exposition précoce à des perturbateurs endocriniens.

Au cours des 20 dernières années, de nombreux travaux ont documenté des effets néfastes sur la santé de composés introduits dans l'environnement par l'activité humaine et capables de perturber le système endocrinien des animaux, y compris les humains. Les efforts de recherche présentés dans ces travaux étaient principalement concentrés sur les actions périphériques de certains de ces composés nommés perturbateurs endocriniens (PE), tandis que seule une petite proportion de la recherche publiée sur les PE examinait directement leurs effets centraux (développement cérébral, neurogenèse, intégrité des circuits neuroendocrines...).

La capacité du cerveau des vertébrés à répondre aux hormones et aux substances qui imitent les hormones commence très tôt dans la vie. Cela est dû à la présence précoce et généralisée de récepteurs d'hormones stéroïdiennes dans le cerveau en développement. Celui-ci est sensible à ce type de molécule, au cours de périodes critiques, pendant lesquelles des changements dans les concentrations d'hormone peuvent induire des effets neurobiologiques immédiatement ou plus tard au cours de la vie. Au-delà des études expérimentales, les données épidémiologiques ont démontré

des corrélations entre les expositions aux PE et l'augmentation d'altérations fonctionnelles neurodéveloppementales ou neurocognitives.

Les mécanismes sous-jacents par lesquels les PE agissent sur le cerveau pour induire des changements neuroendocriniens, neurodéveloppementaux et comportementaux sont loin d'être compris. L'objectif de ce travail est donc d'améliorer ces connaissances afin de fournir des méthodes spécifiques pour l'évaluation de leurs risques.

Il est indispensable de passer aux modèles animaux pour mieux comprendre les mécanismes par lesquels les PE induisent les changements décrits plus haut, modèles qui doivent tenir compte de la complexité cellulaire et tissulaire du cerveau. Le poisson zèbre présente plus de 70% de gènes en commun avec l'Homme et 85% de gènes impliqués dans des pathologies sont communs entre l'humain et le poisson. C'est un modèle utilisé par la communauté scientifique pour la compréhension de divers processus physiologiques et pathologiques. Dans ce contexte, nous nous proposons d'étudier, chez le poisson zèbre, l'impact de 3 molécules identifiées comme PE : l'éthynilestradiol et le Bisphenol F (deux agonistes des récepteurs aux œstrogènes) et le clotrimazole (un inhibiteur d'aromatase, l'aromatase étant l'enzyme permettant la production d'œstradiol). Pour définir comment ces molécules peuvent affecter la neurogenèse et la neurotransmission, nous soumettrons des embryons de poisson zèbre récupérés juste après la ponte à une exposition précoce (de J0 à J4) à 3 doses différentes de chaque molécule. Des marqueurs de neuroplasticité spécifiques seront évalués chez les larves non autonomes (4 jours), les juvéniles (30-40 jours) et les adultes (mâles et femelles de 3-4 mois). La prolifération cellulaire, la migration cellulaire, l'apoptose et la différenciation cellulaire seront évaluées au niveau cérébral par des techniques d'immunofluorescence bien établies et actuellement utilisées dans notre laboratoire.

Les animaux sont élevés 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. Le nombre d'animaux sera réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable (Réduction). Trois répétitions indépendantes seront reproduites. Le nombre d'individus utilisés pour cette étude est de : 540 juvéniles, 540 adultes femelles et 540 adultes mâles. Afin d'améliorer les conditions de vie des poissons zèbres (Raffinement), un suivi strict des animaux sera instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort et la douleur liés à l'expérimentation et la détresse qu'ils pourraient éprouver. Par ailleurs, les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans différents aquariums au sein d'une même salle et bénéficieront ainsi d'un enrichissement adapté.

Ce travail nous permettra de définir les conséquences, sur le développement cérébral à court, moyen et long terme, d'une exposition précoce à des perturbateurs endocriniens.

**20089** Les Encéphalopathies Spongiformes transmissibles (EST) ou maladies à prions sont des maladies neurodégénératives fatales touchant un large spectre d'espèces de mammifères. Elles sont caractérisées par l'accumulation, dans les tissus des individus atteints, d'une isoforme anormale (PrP<sup>Sc</sup>) d'une protéine de l'hôte (PrP<sup>C</sup>), qui constituerait, selon le concept « prion », l'agent infectieux.

La maladie du dépérissement chronique (Chronic wasting disease, CWD) est une EST affectant les cervidés sauvages et d'élevage. Identifiée pour la première fois en 1967 aux Etats Unis, elle est restée cantonnée en Amérique du Nord jusqu'en 2016, année où elle a été détectée en Norvège, chez des rennes, des élans et un cerf. Bien que, depuis, seuls quelques cas supplémentaires aient été recensés chez des élans en Finlande (2018, 2020) et en Suède (2019, 2020), la CWD est considérée comme une menace potentielle pour l'équilibre des populations européennes de cervidés du fait de sa forte contagiosité. En outre, des incertitudes majeures subsistent quant à la capacité des prions responsables de cette maladie à infecter des ruminants domestiques et l'espèce humaine. En effet, les résultats des études menées sur le sujet sont parcellaires, difficilement interprétables à cause de différences méthodologiques inter-études, et ont été obtenus

essentiellement avec des échantillons nord-américains, contenant des souches de prions possiblement différentes de celles circulant en Europe.

Dans ce contexte, les objectifs de ce projet sont :

1/ de caractériser biologiquement un panel d'isolats européens de prions responsables de CWD (n = 8) et de les comparer avec des isolats nord-américains (n = 11)

2/ d'évaluer la capacité de ces agents pathogènes à franchir les barrières d'espèce bovine et ovine

3/ d'évaluer leur potentiel zoonotique, c'est-à-dire leur capacité à franchir la barrière d'espèce humaine

Pour cela, les 19 isolats seront inoculés à onze lignées de souris transgéniques surexprimant une PrPc hétérologue. Actuellement, le recours à ces modèles murins est la méthode de référence pour typer biologiquement les souches de prions et, combinée à des techniques de conversion de la PrP *in vitro* qui seront réalisées par ailleurs, est également considérée comme l'approche la plus pertinente pour évaluer la capacité des prions à franchir les barrières d'espèces.

Au total, le projet nécessitera au maximum l'utilisation de 5490 souris, réparties comme suit :

- axe 1 : 1368 souris, appartenant à 4 lignées transgéniques surexprimant respectivement la PrPc du cerf, du wapiti, de la souris et du campagnol.

- axe 2 : 1026 souris, appartenant à 3 lignées transgéniques surexprimant respectivement la PrPc bovine et 2 variants de la PrPc ovine

- axe 3 : 3096 souris, appartenant à 4 lignées transgéniques surexprimant différents variants de la PrPc humaine

Dans les 3 axes, les effectifs correspondent au nombre minimal d'animaux nécessaires pour permettre la comparaison statistique des durées d'incubation obtenues avec les différents isolats dans chaque lignée.

Tout au long du projet, les animaux seront hébergés en groupes de 6 individus, dans des cages teintées et ventilées, équipées de coton pour la confection de nids et de bûchettes à ronger. Les inoculations seront réalisées par voie intracérébrale, sous anesthésie générale, par un vétérinaire. Ils feront ensuite l'objet d'une surveillance sanitaire quotidienne jusqu'à l'apparition de signes cliniques d'EST, ou jusqu'à 700 jours, en l'absence de maladie apparente. A ce stade, ils seront euthanasiés et des prélèvements seront réalisés post-mortem pour analyses histologiques et biochimiques.

**20090** La colibacillose aviaire est due à une bactérie *Escherichia coli* pathogène aviaire (APEC). Elle est l'infection la plus fréquente en production de volaille, sa maîtrise représente donc un enjeu économique et sanitaire majeur. En particulier, elle est la première cause de traitement antibiotique en élevage de volailles, et il n'existe pas de vaccin efficace contre toutes les souches bactériennes responsables de la maladie.

L'objectif de ce projet est donc de développer un vaccin qui sera élaboré à partir des vésicules de membranes externes (ou VME en abrégé) naturellement produites par les souches d'APEC.

En effet, l'utilisation de VME bactériennes a plusieurs avantages en vaccinologie. Tout d'abord, ces vésicules présentent à leur surface les mêmes antigènes que ceux présents à la surface de la bactérie, ce qui est nécessaire pour induire une réponse vaccinale protectrice vis-à-vis de la souche bactérienne ciblée. De plus, ces vésicules ont une forte capacité adjuvante intrinsèque et sont fortement immunogènes, ce qui est nécessaire pour induire une bonne réponse immunitaire sans avoir besoin d'ajouter d'adjuvants. Elles sont en revanche non infectieuses car elles n'ont pas la capacité de se multiplier. Enfin, ce type de vaccin sera facilement adaptable à la souche d'APEC circulante.

Afin de répondre à cet objectif de développement vaccinal, ce projet a été conçu en plusieurs étapes. Nous avons dans un premier temps caractérisé finement les VME produites par une souche d'APEC cliniquement couramment retrouvée en élevage pour valider la qualité et la reproductibilité de notre production des VME (réalisée selon un protocole bien maîtrisé au laboratoire). Une fois cette

caractérisation établie, nous avons ensuite testé l'activité biologique des VME sur des cultures cellulaires et nous avons bien vérifié qu'elles induisaient une immunostimulation importante des cellules de l'immunité (macrophages).

A ce stade, il est maintenant indispensable de vérifier l'innocuité et l'efficacité des VME dans l'espèce cible, à savoir le poulet, ce qui nécessite le recours à un animal modèle. Afin de se positionner au plus proche des contraintes de la filière avicole, où les vaccinations sont réalisées collectivement sur les animaux de 1 jour avant leur transport en élevage (il est complexe de réaliser des injections individuelles sur un si grand nombre d'animaux), nous avons choisi d'administrer les VME vaccinales à des poulets par des aérosols, c'est-à-dire par pulvérisation de gouttelettes vaccinales qui seront inhalées par les animaux. Cette voie d'administration ne provoque pas de douleur ou de stress chez les animaux. Elle est aussi justifiée par le fait que les APEC infectant les voies respiratoires, le vaccin sera d'autant plus efficace s'il permet d'induire une protection des muqueuses respiratoires, lieu de l'infection.

Le modèle consiste à réaliser une primo-vaccination des animaux à 1 jour de vie, puis de réaliser un rappel vaccinal à 15 jours de vie. Un suivi clinique bi-quotidien des animaux durant toute la durée de l'expérimentation nous permettra de d'établir si le vaccin est à l'origine de potentiels effets secondaires. Puis ces mêmes animaux seront expérimentalement infectés par des APEC à 35 jours de vie pour vérifier l'efficacité du vaccin. Pour cela, un suivi clinique des animaux sera aussi réalisé pendant 10 jours post-vaccination. Ces animaux seront ensuite euthanasiés à 45 jours de vie.

La règle des 3R est respectée :

**Remplacer** : Nous avons réalisé de nombreuses validations *in vitro* et *in cellulo* de manière à garantir la qualité des VME utilisées à des fins vaccinales. Cependant, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun autre modèle ne permet de réaliser une épreuve vaccinale à l'échelle de l'organisme.

**Réduire** : Plusieurs paramètres seront analysés et suivis dans le temps sur le même animal vivant (poids, score clinique, sérologie, charge bactérienne après infection) et après euthanasie (poumons, sacs aériens, bourse de Fabricius, foie, rate et sang).

**Raffiner** : Les poulets seront hébergés au sol sur litière paillée propre avec un accès facilité à l'eau et à l'alimentation avec une longueur minimale de mangeoire par oiseau de 15 cm, comme prévu par la réglementation (directive 2010/63/UE du Parlement européen et du Conseil du 22 septembre 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques). Chaque groupe de 10 animaux sera logé dans un parc de 2m<sup>2</sup>, ce qui correspond à une densité d'environ 0.18 m<sup>2</sup> par individu. Cette superficie est largement supérieure à celle prévue par la réglementation. Les animaux seront ensuite mis en isolateur (par groupe de 10 individus, à une densité d'environ 0.18 m<sup>2</sup> par individu) au moment de l'infection pour éviter de contaminer l'environnement. Leur environnement assurera des conditions d'hygrométrie et de température constantes. Ils auront la possibilité d'exprimer un comportement propre à leur espèce. Le change de la litière est effectué toutes les semaines. La surveillance bi-quotidienne permet de veiller à une hydratation et une alimentation *ad libitum*.

Des problèmes respiratoires, des tremblements, une hyperthermie, absence de toilettage, un état de prostration et/ou une perte de poids supérieure à 20 % du poids initial nous conduiront à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier.

**20091** L'enseignement pratique faisant l'objet de la présente saisine s'adresse aux étudiants de troisième année (VET3) et a pour but de démontrer et de faire pratiquer les techniques d'examen de l'appareil génital et les techniques de reproduction chez le chien. Il fait partie de l'Unité d'Enseignement (UE) 276 - Propédeutique médicale et chirurgicale. Il est indispensable pour permettre aux étudiants de comprendre et de pratiquer les techniques d'examen dont ils auront besoin lors de leur immersion clinique dans le Centre Hospitalier Universitaire Vétérinaire (CHUV).

Pour atteindre cette maîtrise, cet enseignement s'intègre à une formation graduelle par étape :

Il est précédé de cours théorique de l'UE 276 permettant aux étudiants d'acquérir les connaissances théoriques. Il est poursuivi en quatrième année (VET4) par la réalisation de ces techniques

d'examen lors des stages externes et des stages infirmiers réalisés dans le CHUV. Enfin, ces gestes seront utilisés et leur maîtrise sera consolidée au cours des rotations hospitalières de 5<sup>ème</sup> année (VET5) dans le CHUV.

Pour poursuivre ces objectifs, les procédures suivantes seront mises en oeuvre sur 10 femelles et 4 mâles.

Chez la femelle :

Examen de la vulve et frottis vaginal

Examen du vagin

Examen de l'utérus

Technique d'insémination artificielle

Chez le mâle

Examen du périnée, des testicules et du pénis

Récolte de sperme

Chaque séance dure 1 heure et concerne 8 étudiants sous la responsabilité d'un enseignants clinicien, docteur vétérinaire, spécialisé en biotechnologie et pathologie de la reproduction canine.

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

Remplacer : Le chien est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer les démonstrations et pratiques dans les meilleures conditions pour les animaux.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long des journées d'enseignement et également les journées suivantes par le personnel animalier.

**20092** Grace à une analyse prédictive de la réponse de cellules tumorales à une cytokine immunitaire, nous avons identifié et validé des gènes cibles affectant leur sensibilité. Une de ces cibles se trouvant surexprimée dans les cellules résistantes a fait l'objet d'une validation expérimentale en utilisant des inhibiteurs pharmacologiques dans un essai en culture cellulaire. Ces inhibiteurs spécifiques de cette cible ont montré une augmentation significative du mécanisme actif de la cytokine immunitaire et une augmentation de la mort cellulaire : une probabilité de survie des cellules tumorales inférieure à 0,1. Dans ce projet, nous souhaitons donc associer un des inhibiteurs identifiés (déjà utilisé chez la souris), à une immunothérapie utilisée actuellement dans le cancer dans le but d'induire une régression efficace des tumeurs pulmonaires. Nous utiliserons des souris commerciales qui possèdent un système immunitaire fonctionnel. Nous injecterons des cellules tumorales issues de poumon de souris en sous cutané dans un seul flanc, ce qui permet de suivre facilement la croissance tumorale. L'injection n'est pas douloureuse pour l'animal. Une fois l'injection réalisée, le comportement des animaux sera suivi quotidiennement de façon à prévenir l'apparition d'une douleur trop forte, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R.

**REDUCTION:** Pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, tout en obtenant des résultats statistiquement relevant, nous avons utilisé le logiciel de statistique prévisionnel (biostatgv).

**RAFFINEMENT:** Nos précédents résultats *in vitro* et des précédents résultats *in vivo* issus de la littérature ont démontré l'absence de toxicité de l'inhibiteur sur les animaux. Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée, pour limiter cette douleur, nous avons établi une grille d'observation visant à définir les points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et qui indiquent les mesures que nous prendrons à l'apparition des premiers signes de la douleur. Toutes ces mesures seront prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation.

**REMPACEMENT:** Seuls les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires, en particulier les relations complexes entre le système

immunitaire et les tumeurs Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal. Dans ce cadre la souris est utilisée.

Nous testerons 1 combinaison thérapeutique sur un modèle tumoral. Pour cela nous aurons besoin au maximum de 64 animaux.

**20093** Les formations spécifiques en expérimentation animale constituent une obligation réglementaire à laquelle doivent se soumettre tous les acteurs de la recherche *in vivo* afin d'acquérir les outils nécessaires à la mise en place d'une démarche éthique prenant en considération la sensibilité animale.

Ceci implique notamment, pour les personnes concevant ou réalisant des interventions chirurgicales dans le cadre des projets scientifiques, l'obligation réglementaire de suivre préalablement un enseignement théorique et pratique à la chirurgie expérimentale.

Ce projet concerne les travaux pratiques d'une formation à destination de ces personnes, aux bases de la chirurgie expérimentale avec utilisation d'animaux vivants, qui s'inscrit dans ce cadre réglementaire et éthique et qui a obtenu l'approbation du Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.

La partie pratique de cette formation, d'une durée totale de 8h, permettent aux personnels d'apprendre à mettre en oeuvre les gestes de base, encadrés par des formateurs expérimentés. Ils seront réalisés sur rats ou souris, les espèces les plus utilisées en recherche.

La première, et majeure, partie des travaux pratiques se déroule sur substituts synthétiques inertes et cadavres d'animaux (issus préférentiellement d'euthanasies indépendantes de la formation).

Ceci permet tout d'abord une réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins pédagogiques, une réutilisation des animaux éliminés dans les services de zootechnie, un remplacement de l'animal par des méthodes alternatives autant que possible, et s'inscrit donc parfaitement dans la démarche éthique et la règle des 3R.

Au terme de cette première partie de travaux pratiques réalisés sans animaux vivants, un seul rongeur vivant par participant sera utilisé pour la réalisation d'une chirurgie complète. Ces animaux seront préférentiellement, dans un souci de réduction également, issus du stock d'animaux de réforme destinés à être éliminés.

A ce stade, le participant a acquis toutes les notions et gestes indispensables à la bonne mise en oeuvre et surveillance d'une anesthésie et analgésie adaptée, ainsi qu'à la réalisation d'une chirurgie aseptique et atraumatique.

La procédure chirurgicale réalisée est une ovariectomie.

Les animaux seront anesthésiés et ils recevront une injection sous-cutanée d'un analgésique afin d'éviter toute douleur à l'animal et de raffiner au mieux la technique.

Les stagiaires observeront les phases de l'anesthésie, s'assureront de l'état de profondeur de celle-ci puis réaliseront la chirurgie, pour laquelle il se sont d'abord entraînés sur cadavre.

Ils surveilleront ensuite le réveil de l'animal, puis les animaux seront euthanasiés.

Le nombre de stagiaires par session de formation est estimé à 8. Une session au maximum est prévue par an, ce qui, sur une période de 5 ans, représente au maximum :

- 50 rongeurs euthanasiés

- 50 rongeurs vivants

A chaque session de formation, seront utilisés par stagiaire :

- 2 rongeurs maximum, euthanasiés au préalable, préférentiellement pour des raisons indépendantes de la réalisation de la formation, pourront être requis pour faire une démonstration de dissection lors des travaux pratiques d'anatomie, selon le niveau de connaissance des participants.



- 1 rongeur mort par stagiaire, pour la réalisation d'une chirurgie d'entraînement sur cadavre. Cet animal aura également été euthanasié au préalable et préférentiellement pour des raisons indépendantes de la réalisation de la formation.
- 1 rongeur vivant par stagiaire et par TP, pour la réalisation d'une chirurgie en conditions réelles. 2 animaux supplémentaires sont prévus à chaque session, dans le cas où un décès surviendrait avant la réalisation complète de la chirurgie par un ou 2 stagiaires.

**20094** Depuis que les progrès de la chirurgie pédiatrique permettent de réparer les malformations cardiaques congénitales au cours des premières semaines de vie des enfants, ces pathologies ont de plus en plus d'impact chez des patients adultes. Les modèles souris de ces pathologies ont déjà apporté une meilleure compréhension des mécanismes biologiques sous-jacents aux malformations cardiaques. Nous avons pour objectif de poursuivre ces efforts en recherchant comment prévenir ces maladies congénitales. Un facteur déterminant à l'origine de ces malformations est le régime alimentaire de la mère.

Chez la souris, nous avons mis en évidence qu'un régime pauvre en vitamine D au cours de la gestation conduisait à l'apparition d'une hypertrophie cardiaque chez les fœtus et nouveaux nés. Cette hypertrophie persiste à l'âge adulte chez la souris adulte et est également retrouvée dans la seconde génération issue de ces souris alors qu'elles sont nourries avec un régime normal.

Notre projet consiste en la poursuite de cette étude en analysant l'impact de la déficience en vitamine D associé à l'obésité, autre facteur impliqué dans les cardiopathies.

Pour ce projet, nous allons nourrir des souris femelles avec des alimentations normales, riches en gras avec ou sans carence en vitamine D. Ces femelles seront ensuite mises en accouplement et leurs embryons, fœtus et nouveaux nés seront collectés pour faire des analyses de la morphologie cardiaque, d'expression génique et épigénétiques. De plus, certains individus seront maintenus jusqu'à l'âge de 3 à 6 mois afin de réaliser des études de fonction des cœurs par échocardiographie. Le projet nécessite 288 souris, nombre minimal pour obtenir une étude concluante tout en veillant à respecter au mieux la règle des 3R par les actions suivantes

Remplacer : notre projet se fera dans la continuité d'une étude *in vitro* réalisée à partir d'organoides cardiaques formés à partir de cellules souches pluripotentes

Réduire : Le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour mettre en évidence un impact du régime et avoir des données statistiques permettant une interprétation claire des résultats sans avoir à répéter des expériences.

Raffiner : les besoins physiologiques des animaux seront respectés Des points limites clairs seront définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption

**20095** La production de truite arc en ciel en France s'oriente de plus en plus vers des poissons de grande taille destinés à la fumaison et vendus sous forme de tranches fines. La présence du muscle rouge, facilement repérable par sa couleur brune est fortement préjudiciable pour la vente. En effet, outre l'aspect visuel, le muscle rouge riche en lipide s'oxyde rapidement conduisant à des défauts de flaveur. Les caractéristiques histologiques et de croissance du muscle rouge au cours de la vie de l'animal est mal connu actuellement. De même, la variabilité individuelle de la proportion de muscle rouge est inconnue or c'est un facteur déterminant pour estimer la faisabilité d'une contre-sélection génétique de ce caractère par marqueurs génétiques. Enfin, l'impact d'une faible proportion de muscle rouge sur les capacités de nage des poissons est également inconnu. Il y a donc un enjeu agronomique mais également scientifique à conduire des recherches sur la croissance du muscle rouge chez la truite.

Les objectifs du projet sont i) de déterminer si la proportion de muscle rouge est héritable, ii) d'identifier des SNP (Single Nucléotide Polymorphisme), et iii) de déterminer s'il existe une corrélation entre la proportion de muscle rouge et les capacités de nage du poisson. Il s'agit notamment de vérifier si une proportion faible de muscle rouge n'entraîne pas de défauts dans la

capacité de nage ce qui pourrait nuire au bien-être de l'animal. De plus, l'identification de marqueurs génétiques pourra permettre d'identifier des gènes impliqués dans le développement du muscle rouge.

Pour répondre à ces objectifs nous allons tester la capacité de nage de poissons qui seront également utilisés pour calculer les paramètres génétiques de la proportion du muscle rouge.

Le projet respectera la règle des 3R :

Remplacer : l'objectif de cette étude est de tester les capacités de nage des poissons ce qui ne peut se faire par définition que sur animaux vivants.

Réduire : les études génétiques nécessitent 2000 d'individus issus du croisement de 20 pères avec 20 mères en accord avec les recommandations des généticiens partenaires du projet. Ce nombre a minima permettra d'obtenir des mesures précises et fiables des paramètres génétiques de la proportion de muscle rouge.

Raffiner : les animaux seront élevés dans les conditions optimales pour l'espèce (photopériode, qualité d'eau, densité, nourriture, enrichissement) et la manipulation des animaux sera réduite au maximum.

**20096** Les lésions de la moelle épinière cervicale représentent la principale cause non infectieuse de troubles neurologiques chez le cheval. Ces lésions, le plus souvent d'origine compressive, sont à l'origine de signes cliniques de type incoordination locomotrice pouvant présenter un degré de sévérité variable. Si les signes cliniques sont évocateurs chez des chevaux gravement atteints, les troubles discrets de la coordination des mouvements sont parfois difficiles à identifier même pour des vétérinaires expérimentés. L'imagerie des lésions de la moelle épinière cervicale chez le cheval est donc un enjeu majeur à titre diagnostique et pronostic.

L'examen scanner réalisé sous anesthésie générale avec injection d'un produit de contraste iodé dans le liquide cérébro-spinal appelé myéloscanner représente aujourd'hui la méthode de référence pour l'évaluation des lésions de la moelle épinière cervicale chez le cheval.

Différentes études récemment publiées dans des revues internationales illustrent l'intérêt de l'examen myéloscanner pour le diagnostic des lésions compressives de la moelle épinière. Cependant toutes ces études n'ont examiné que des chevaux lésés et soulignent le manque de données de référence établies sur une population de chevaux sains impactant fortement la pertinence diagnostique (sensibilité et spécificité) de l'examen myéloscanner dans des cas cliniques complexes.

L'objectif de ce projet est donc d'établir chez des chevaux adultes sains des données de référence de la moelle épinière cervicale évaluée par examen myéloscanner. Dix chevaux cliniquement sains seront examinés par cette technique sous anesthésie générale selon un protocole classique afin d'établir des valeurs de référence de la morphologie de la moelle épinière par rapport au canal vertébral et aux méninges. Le nombre de 10 chevaux a été défini comme le nombre minimal de chevaux permettant de prendre en compte les variabilités interindividuelles dans l'établissement des premières données de référence morphologique et de signal de la moelle épinière cervicale chez le cheval adulte sain.

Enfin concernant le raffinement de cette étude qui ne peut se réaliser que dans l'espèce cible, les chevaux sont hébergés en groupe en paddock (avec abris, eau et foin à volonté) dans les conditions proches du milieu naturel. Ils ne sont placés en boxe que la veille de l'examen myéloscanner et les 36 heures suivant l'anesthésie générale. Lorsqu'ils sont en boxe (4 x 4 mètres) un contact visuel avec d'autres congénères est assuré et une mise à disposition permanente de fourrage et d'eau est réalisée si ce n'est dans les 8h précédant l'examen où la mise à jeûn est requise pour l'anesthésie générale. De même les 2 premiers repas suivant l'anesthésie se composent d'une alimentation riche en fibre et humidifiée (« mash ») permettant de limiter le ralentissement du transit intestinal secondaire à l'anesthésie. Par ailleurs juste avant et pendant la réalisation de l'examen myéloscanner, une injection d'anti-inflammatoires est réalisée afin d'améliorer le confort du cheval dans les heures suivant l'examen en limitant un possible effet inflammatoire du produit de contraste

iodé. Le risque principal de dommages causés aux chevaux dans ce protocole expérimental est le risque inhérent à toute procédure réalisée sous anesthésie générale. Ce risque est néanmoins particulièrement réduit car l'examen est de courte durée (environ 45 min) et s'effectue sur de jeunes adultes en bonne santé.

**20097** Dans le contexte actuel de raréfaction des ressources naturelles, de compétition potentielle de l'utilisation de ces ressources pour la production d'animaux de rente ou pour nourrir directement l'homme, il est aujourd'hui important de bien connaître la valorisation nutritionnelle de ces ressources dans l'alimentation des ruminants. Cette connaissance permet d'ajuster au mieux les apports nutritionnels dans les rations, pour couvrir les besoins des animaux tout en minimisant les rejets, en particulier ceux qui peuvent poser des problèmes d'un point de vue environnemental (azote, phosphore, oligoéléments).

Le 1er critère permettant d'évaluer cette valeur nutritionnelle est sa digestibilité, c'est-à-dire la partie assimilable par l'animal, non retrouvée dans les fèces. Les mesures de digestibilité des différents constituants des rations utilisées chez le ruminant (fourrages, matières premières, minéraux, vitamines) se font *in vivo* à l'aide d'une méthode standardisée, aussi utilisée pour établir les valeurs tables de digestibilité des matières premières publiées. Aucune méthode *in vitro* fiable n'existe actuellement pour évaluer ce paramètre, en particulier pour des constituants de ration peu caractérisés.

Cette méthode *in vivo* est basée sur la mesure précise d'une part des quantités ingérées, et d'autre part des quantités excrétées, via une collecte totale et séparée des urines et des fèces. Cette méthode utilise le mouton mâle castré comme modèle expérimental, car il permet une collecte de fèces plus aisée que le bovin, ainsi qu'une collecte séparée des urines et des fèces. La castration est nécessaire car elle permet d'avoir des animaux plus calmes et plus adaptés au système de contention dans les cases de digestibilité. La mesure de digestibilité nécessite en effet une maîtrise fine des quantités ingérées et des quantités excrétées (urines et fèces) par les moutons, qui sont à cet effet maintenus dans des cases de digestibilité individuelles sur caillebotis pendant la période de mesure (7 à 14 jours consécutifs). Une période d'adaptation au régime (de 1 à 2 semaines) est également nécessaire avant ces mesures, dans des cases individuelles paillées respectant les normes de logement en conditions expérimentales.

Pendant la période de collecte des fèces et urine, des prises de sang (maximum 10 ml par prélèvement) pour dosage des nutriments ou de leurs métabolites peuvent également être réalisées (sur 3 jours maximum), afin d'évaluer le devenir des nutriments absorbés. Au-delà de 5 prises de sang prévues par période de mesure, un cathéter jugulaire est posé sur chaque animal au début de la période de mesure, permettant de limiter au maximum le stress et la douleur ressentis par l'animal au moment des prélèvements.

Les cases (d'adaptation et de digestibilité) sont aménagées pour que ces animaux, naturellement grégaires, puissent voir et sentir leurs congénères, et sont équipées d'au moins un objet d'enrichissement (enrichissement auditif par de la musique + corde, brosse ou autre objet qui pourra être identifié comme pertinent). Les deux types de cases sont dans le même bâtiment, équipé d'un système de ventilation dynamique. Des points limites, au-delà desquels l'animal est remis en condition d'élevage standard, sont définis. Les animaux inclus dans ce projet passeront au maximum 18 semaines par an en case de digestibilité (avec ou sans prélèvements sanguins), réparties tout au long de l'année. Ils auront tous également une période de repos d'au moins 8 semaines consécutives par an.

24 moutons, d'un poids au moins égal à 30 kg et âgés d'au moins 7 mois au démarrage du projet sont prévus; 12 pour la réalisation des mesures, + 12 animaux potentiels supplémentaires, non présents initialement, si un renouvellement d'un ou plusieurs des 12 animaux prévus initialement est nécessaire. Ce nombre permet d'étudier chaque régime sur 4 à 9 moutons, selon la variabilité de la digestibilité du nutriment étudié, effectif défini permettant de détecter des différences de digestibilité de l'ordre de 5-10%. La présence de 12 moutons en permanence sur le site permet d'avoir quelques moutons de remplacement, dans le cas d'animaux malades, ou ayant dû être sortis

de l'essai suite à l'atteinte de points limites identifiés, et de prévoir des périodes de repos plus importantes, tout en optimisant la vitesse d'avancement des recherches. Ce projet est prévu sur 36 mois, période pendant laquelle l'âge des animaux n'induit pas de biais sur les mesures de digestibilité.

Dans la mesure du possible, les animaux utilisés dans ce projet sont des moutons déjà castrés achetés auprès d'un fournisseur extérieur. Si aucun fournisseur de moutons castrés n'est disponible, la castration est effectuée dans l'unité expérimentale, sous anesthésie locale, par un vétérinaire. A leur arrivée, les moutons auront une période de quarantaine de 14 jours en case collective ou au pâturage avant d'intégrer la procédure expérimentale.

**20098** Le cancer du foie est la deuxième cause de décès liés au cancer. C'est un cancer particulièrement agressif ; son taux de survie à 5 ans est estimé à 13 %.

Les carcinomes hépatocellulaires (CHC) sont à l'origine de 80 à 90% de tous les cancers primitifs du foie. Son incidence continue à augmenter dépassant 9 000 nouveaux cas par an en France et près d'un million de nouveaux cas par an dans le monde. Le CHC se développe à la suite d'une maladie inflammatoire chronique du foie et, le plus souvent, d'une cirrhose hépatique.

Bien que les programmes de dépistage permettent de diagnostiquer environ 40 % des CHC à un stade où des traitements curateurs peuvent être proposés, au moins la moitié de patients relèvera d'un traitement systémique à un stade plus avancé de la maladie. À ce stade avancé, le pronostic reste encore défavorable.

Le traitement clinique du CHC reste difficile en raison du haut taux de la récurrence des patients atteints et de l'aspect asymptomatique des premiers stades de la maladie. Il est donc important de caractériser les anomalies moléculaires responsables de la prolifération anormale des cellules hépatiques cancéreuses et de permettre à terme d'identifier des biomarqueurs prédictifs de la réponse aux traitements ou de nouvelles cibles thérapeutiques.

Notre objectif est de confirmer *in vivo* les résultats obtenus *in vitro* concernant le rôle d'un facteur nucléaire (forme phosphorylée de NF-kappaBp65 au niveau de la serine 468) dans la prolifération du CHC. Dans ce but, nous envisageons d'injecter à des souris des cellules CHC humaines (lignée HUH7) sauvages (WT) ou mutées au niveau de la serine468 de NF-KappaBp65 et d'observer la croissance tumorale. Ce projet pourrait aboutir à l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique et à la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques afin de provoquer l'arrêt de prolifération des CHC.

Dans ce projet, nous utiliserons 20 souris Nude qui seront réparties en deux groupes de 10 afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous pratiquerons des xénogreffes en sous-cutanées de cellules tumorales HUH7 exprimant NF-KappaBp65 WT ou muté au niveau de la serine468.

Nous suivrons le développement tumoral en mesurant le volume tumoral. Il est indispensable de développer des modèles expérimentaux *in vivo* les plus proches possible de la maladie humaine, chose qui n'est pas possible *in vitro* compte tenu du nombre et de la complexité des systèmes biologiques mis en jeu.

Dans notre modèle, les cellules tumorales humaines sont implantées en sous cutané intégrant ainsi un micro-environnement naturel et complexe qui joue un rôle sur la croissance tumorale. Des anesthésies seront mises en place lors de la réalisation de ce projet. Les animaux seront observés tous les jours et l'étude sera stoppée à partir de points limites précoces qui prendront en compte la taille de la tumeur et l'état général de la souris. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress.

**20099** Chez le porc, les céréales représentent une part importante de l'énergie de la ration. Dans le système d'alimentation français, on attribue une valeur énergétique à chaque matière première constituant l'aliment. Cette valeur énergétique est estimée à partir de l'utilisation métabolique des

nutriments (protéines, glucides, lipides) par l'animal. Cette utilisation métabolique est différente dès lors que la cinétique d'apport ou la quantité de nutriments absorbables au niveau de l'intestin grêle est modifiée. C'est le cas par exemple lorsque l'on cuit une céréale, les glucides sont plus rapidement digérés par l'animal. Une concentration importante de glucose est alors absorbée et disponible immédiatement pour le métabolisme énergétique, impliquant des mécanismes de régulation sous-jacents. Ces mécanismes de régulation peuvent être physiques (vitesse de transit), chimiques (hormones de régulation) ou métaboliques. L'objectif du projet est de comparer les utilisations digestives et métaboliques de combinaisons d'aliments contenant des céréales cuites selon des intensités de cuisson différentes chez 154 porcs en croissance d'un poids d'environ 60 kg. Les mesures comprendront la mesure individuelle des aliments ingérés, la collecte des fèces et des urines et la mesure de la production de chaleur à l'état nourri et en situation de jeûne. A notre connaissance très peu d'études dans notre thématique ont été menées chez le porc mâle entier. Un autre objectif de ce projet est donc de fournir des références en terme de valeurs nutritionnelles des aliments chez le porc mâle entier.

Le projet a été établi dans le respect de la règle des 3R. Remplacer : les mesures sur animaux sont inévitables car l'objectif de l'étude vise une meilleure connaissance de l'utilisation des aliments au sein du tube digestif de l'animal et l'étude de leur métabolisme énergétique. Réduire : le nombre d'animaux par modalité a été évalué à 7 sur la base d'essais antérieurs afin d'atteindre le niveau de précision souhaité. En particulier, les données issues du projet sont destinées à intégrer des tables de valeurs nutritionnelles des matières premières pour les animaux d'élevage servant de références pour l'alimentation des animaux. Raffiner : Dès que cela sera possible les cages individuelles dans lesquelles seront hébergés les animaux seront adjacentes afin que les animaux ne soient pas isolés. Durant les premières semaines d'adaptation, les cages permettront aux animaux de se mouvoir librement. Par la suite, les besoins du projet nécessitent de limiter les mouvements des animaux. Pour autant, la taille des cages sera systématiquement maximisée afin de laisser le maximum d'espace disponible aux animaux. Toutes les cages sont 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.

**20100** La thérapie génique a progressé ces dernières années et des protocoles cliniques sont actuellement testés chez l'homme. Néanmoins, plusieurs obstacles doivent être surmontés avant que ce type de thérapie soit couramment utilisé. Une limitation majeure à l'utilisation de la thérapie génique est la nécessité de moduler l'expression d'un transgène en terme de durée et de niveau d'expression. Nos connaissances dans le domaine de la nutrition protéique nous ont permis de concevoir un système d'expression génique inductible par une manipulation nutritionnelle.

Ce système breveté est basé sur l'association (i) d'un vecteur viral et (ii) d'un régime alimentaire particulier. Le vecteur viral Adeno-Associated Virus (AAV) comprend une construction d'ADN avec un promoteur artificiel fortement inductible par une carence en un acide aminé essentiel (AAI) qui dirige la transcription d'un gène d'intérêt thérapeutique. Le régime alimentaire est une nourriture carencée en un AAI. Le vecteur viral est injecté dans la circulation et va transduire tous les cellules du tissu cible (le foie dans le cas présent). La consommation de cette nourriture entraîne une forte baisse de la concentration sanguine de l'AAI limitant, déclenche une voie de signalisation appelée GCN2/ATF4 qui conduit à l'induction du transgène dans le tissu ciblé.

Ce système présente de nombreux avantages : (i) il permet de contrôler précisément l'induction d'un « gène médicament » en terme de durée et d'intensité et (ii) il ne présente aucune toxicité. Si le traitement doit être renouvelé, il sera possible d'alterner la carence en différents AAI. Sur ce point, notre système présente un avantage unique par rapport aux autres systèmes inductibles qui ne sont pas utilisables en médecine humaine. Ce système est un outil fonctionnel dans plusieurs tissus et utilisable en thérapie génique pour exprimer n'importe quel « gène médicament » de façon localisée

et régulée. Cette modulation spatio-temporelle ouvre de nouvelles perspectives à la thérapie génique pour le traitement d'un grand nombre de pathologies (cancer, maladies neurodégénératives, maladies rares, ophtalmologie, thérapie cellulaire...).

Nous souhaitons apporter une preuve de concept de la fonctionnalité de ce système dans le domaine du cancer. L'objectif est d'enrichir la tumeur et son environnement en cellules du système immunitaire. Il a été clairement montré que plus l'infiltrat de cellules immunitaires dans la tumeur est important, meilleure est la réponse aux traitements. Le but est donc de contrôler l'expression de cytokines chimio-attractantes tout d'abord sur des souris porteuses de greffes tumorales syngéniques (lignées cancéreuses murines) puis sur un modèle murin de métastases hépatiques du cancer colorectal (MHCC). La production de ces chimiokines devrait induire le recrutement et l'activation des lymphocytes TCD8 dans la tumeur, et ainsi modifier son microenvironnement et son développement.

Ce projet, qui va impliquer 264 souris, sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement):

- Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction).

- Durant l'étude, tout sera mis en œuvre pour minimiser le stress auquel les animaux sont soumis (Raffinement). Les animaux seront hébergés individuellement, et des éléments d'enrichissement du milieu seront mis à disposition (tube plastique rouge et/ou bille métallique). Pour chaque expérience, des points limites (perte de poids, prise alimentaire, comportement...) seront définis et des groupes "contrôles" adaptés au protocole seront constitués. Si un animal présentait un état douloureux inacceptable, ou des signes de mal-être important, il sera examiné par un responsable du bien-être animal en coordination avec un responsable de la mise en œuvre du projet, et si nécessaire, anesthésié puis euthanasié. Par ailleurs, l'utilisation de cellules exprimant la luciférase pour générer les métastases nous permettra de suivre leur évolution à l'aide d'une méthode non invasive.

**20101** L'Arthrose (OA) est la maladie dégénérative articulaire la plus répandue. Elle touche aussi bien les articulations périphériques que rachidiennes. Au sein des articulations, tous les composants de l'articulation sont impactés. L'OA se caractérise par une érosion du cartilage, la formation d'ostéophytes, une sclérose osseuse sous chondrale et une inflammation synoviale. L'OA est décrite comme la conséquence d'une perturbation de l'homéostasie des tissus cartilagineux et s'accompagne d'une diminution de l'autophagie et d'une accumulation de cellules sénescents. Le vieillissement étant l'un des principaux facteurs de risque de l'OA, nous proposons de tester des molécules capables de jouer sur la régulation des voies métaboliques impliquées dans le vieillissement. Le thiamet-G (TG), un composé augmentant la O-GlcNAcylation des protéines processus agissant sur l'autophagie. La glucosamine (GLcN) composé connu pour ces effets anti-inflammatoires et enfin la Triéthylentétramine dihydrochloride (TETA), molécule mimant la restriction calorique et stimulant l'autophagie.

Il semble essentiel de déterminer les effets de ces composés au niveau articulaire, après leur ingestion et digestion *in vivo*. Le modèle d'OA que nous avons choisi est un modèle naturel d'OA liée au vieillissement. Ce projet vise donc à étudier, dans le contexte articulaire, les effets de ces composés. Les molécules seront administrées par voie orale en supplémentation dans l'eau de boisson à partir de l'âge de 18 mois et jusqu'à l'âge de 24 mois chez la souris C57BL/6 mâles.

Ces différentes molécules ayant déjà été administrées chez la souris via l'eau de boisson dans le cadre d'autres études (TG, TETA, GLcN), il ne nous semble donc pas pertinent de réaliser une étude préalable sur l'impact de l'ajout de ces composés dans l'eau de boisson.

Cette demande d'autorisation de projet consistera en l'évaluation de l'impact du TG, TETA et GLcN sur l'évolution de l'OA chez la souris vieillissante.

Pour cela, les souris C57BL/6 mâle âgées de 18 mois seront réparties en 4 groupes comme décrit dans la session 3.3.2 à raison de 15 souris/ groupe et traitées pendant 6 mois avant d'être

euthanasiées et le niveau d'OA évalué par analyses micro scanner, histologiques, immunohistochimiques et protéiques.

Durant toute la durée de l'expérimentation les souris seront observées quotidiennement et pesées 1 fois par semaine jusqu'à la fin de celle-ci. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites. Ces analyses prennent en compte la règle des 3R :

- Je réduis le nombre d'animaux par groupe au nombre minimal requis pour chaque type de test afin d'atteindre une significativité statistique (soit 15 animaux par groupe pour la procédure expérimentale n°1). Cette saisine nécessitera donc 60 souris C57BL/6 mâles âgées de 18 mois.

- Je raffine ma procédure en hébergeant les souris en groupe sociaux à raison de 5 souris par cage avec de l'enrichissement type frisottis. Par ailleurs, des points limites ont été identifiés et les procédures de raffinement à mettre en place lors de l'atteinte de ces points limites ont été décrites. Malheureusement, je ne peux pas remplacer cette expérimentation animale par un modèle *in vitro*, car cette étude visant à déterminer l'effet de nos molécules sur l'apparition et l'évolution de l'OA nécessite l'intervention du système digestif et de l'articulation dans son ensemble ce qui ne peut pas être reproduit *in vitro*. Il n'existe donc pas de méthodes alternatives à l'utilisation d'animaux pour ce projet.

**20102** Notre projet de recherche vise à caractériser les activités oncogéniques et métaboliques de l'hormone FGF19. Le gène codant pour cette hormone est notamment fortement surexprimé dans les tumeurs de patients atteints de carcinome hépatocellulaire, le principal cancer primitif du foie. 800 000 personnes décèdent chaque année dans le monde de ce cancer, ce qui en fait la troisième cause de décès liée au cancer. De plus, son incidence est en augmentation, en partie à cause des nouvelles habitudes alimentaires menant au surpoids. Le mauvais pronostic vital des patients atteints de carcinome hépatocellulaire est dû notamment à un manque de traitements systémiques efficaces pour les stades avancés de la maladie. Cette absence de solutions thérapeutiques découle en partie de la caractérisation incomplète des événements oncogéniques menant à ce type de cancer. Il est donc essentiel de poursuivre des travaux de recherche afin d'améliorer la compréhension des mécanismes moléculaires de la carcinogenèse hépatique, tout particulièrement les relations entre les cellules tumorales et l'environnement. Dans cette optique, l'utilisation de modèles animaux reproduisant certains aspects de la pathologie humaine est une étape indispensable et il n'existe pas d'autre alternative. Dans le cas du carcinome hépatocellulaire, le modèle animal utilisé par la communauté scientifique et médicale est la souris, *Mus musculus*.

Afin de déterminer au niveau moléculaire les effets oncogéniques et métaboliques de FGF19, nous allons générer des souris surexprimant ce gène par transfection des hépatocytes, en combinaison ou pas avec d'autres événements oncogéniques tels que l'expression de la protéine Myc ou l'inactivation du suppresseur de tumeur p53. Les animaux permettront donc in fine de constituer une banque de tumeurs du foie. Nous étudierons les effets de l'expression de FGF19 sur le métabolisme des souris nourries en régime normal ou enrichi en graisses, sur leur fonctionnement hépatique et sur le processus de carcinogenèse hépatique.

Ce projet est conforme aux exigences des 3R, intégrant les notions et exigences de remplacement, réduction et raffinement. Concernant le remplacement, nous avons réalisé une première partie de l'étude *ex vivo*, avec des lignées hépatiques. Nous avons étudié au maximum les données issues de la caractérisation moléculaire de biopsies de patients. Il est désormais nécessaire de confirmer et étendre les résultats obtenus dans un modèle permettant de reproduire la complexité de l'organe et le développement de la pathologie, qui ne peut être qu'un modèle animal. Pour la notion de réduction, une analyse bibliographique poussée et des expériences *ex vivo* ont été réalisées afin de définir précisément les questions à poser et limiter le nombre d'animaux utilisés. Nous avons effectué avec le service de statistiques de notre institut les calculs permettant de déterminer qu'un nombre de 500 souris est le nombre minimum afin de mener à bien l'étude tout en gardant des résultats exploitables en termes statistiques. Enfin, concernant le raffinement, les procédures expérimentales sont bien définies, les procédures sont réalisées par du personnel qualifié et habilité

dans le cadre de la réglementation définie par les dispositions européennes et nationales et formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux. La croissance de tumeurs hépatiques n'entraîne pas de souffrance chez les souris (et elles restent souvent non détectées chez les patients avant les stades tardifs de la maladie). Les points limites des nos procédures sont bien déterminés, en accord avec le comité de bien-être animal de notre institut de recherche, et aucune dérogation n'est nécessaire. Les animaux utilisés au cours de cette expérience seront maintenus dans des conditions optimales intégrant tous les aspects garantissant le bien-être de l'animal (hébergement, enrichissement du milieu, surveillance régulière de leur bien-être, soins, manipulation, expérimentations). Les retombées de ce projet sont essentielles pour une meilleure compréhension de la pathologie humaine et la possibilité de développer un jour des approches thérapeutiques basées sur l'inhibition de la voie FGF19.

**20103** Les dispositifs pyrotechniques sont utilisés pour divers usages, parmi lesquels le divertissement (feux d'artifice), la protection des biens et des personnes (fumées obscurcissantes) et les opérations militaires (fumées de masquage ou de signalisation). Les individus qui les manipulent et qui les subissent pouvant être exposés aux fumées générées par la combustion de ces dispositifs, une évaluation de leur toxicité est nécessaire. De plus, les industriels qui les utilisent et/ou souhaitent les mettre sur le marché doivent montrer qu'ils maîtrisent les risques de l'exposition à ces produits. Compte-tenu des scénarii d'usage, la principale voie d'exposition aux fumées est la voie respiratoire, mais l'exposition des yeux et de la peau est également importante à considérer. Aucune donnée ne renseigne sur les concentrations de produits de combustion auxquelles les personnes sont susceptibles d'être exposées, néanmoins lors d'un déclenchement, l'exposition aux fumées est vraisemblablement de courte durée du fait de leur dilution dans l'atmosphère. Une exposition de type aiguë est ainsi à considérer. Les notions de réversibilité des effets et d'apparition d'effets retardés doivent également être évaluées pour rendre compte de la dangerosité des expositions. Ce projet porte sur la réalisation d'études de toxicité aiguë par inhalation de fumées issues de dispositifs pyrotechniques. Il utilisera au maximum 3230 rats.

Il est envisagé sur une durée de 5 ans avec une prévision d'un maximum de 50 expositions à des fumigènes sur cette période. Le projet comprend cinq procédures, une procédure expérimentale obligatoire (Procédure 1), correspondant à l'exposition par inhalation aux fumées dans une chambre corps entier au maximum durant 4h, trois procédures d'évaluation des effets de cette exposition, qui seront appliquées pour chaque fumigène testé au cas par cas en fonction des paramètres toxicologiques d'intérêt à étudier, définis par rapport au scénario d'exposition (Procédure 2 : étude des fonctions respiratoires par pléthysmographie corps entier, Procédure 3 : étude des fonctions cognitives, Procédure 5 : étude de la mécanique pulmonaire par la mesure de la capacité du poumon à modifier son volume en réponse à une variation de pression), et une procédure de mise au point du protocole d'évaluation de la mécanique pulmonaire (Procédure 4 : détermination des conditions optimales d'essai pour la réalisation de la mesure prévue dans la Procédure 5).

Un maximum de 64 rats seront utilisés par fumigène testé (16 animaux/sexe exposés aux fumées générées par le déclenchement d'un fumigène [lot 1] et 16 animaux témoins/sexe exposés à l'air [lot 2]), soit 3200 rats pour 50 dispositifs pyrotechniques.

Après exposition aux fumées ou à l'air, les animaux seront sacrifiés à des temps définis (dans les 24h après exposition, 24h après exposition ou 14 jours [voire 28 jours selon les réactions de toxicité] après exposition) pour l'analyse d'échantillons biologiques prélevés post mortem.

Pour évaluer un potentiel effet d'irritation cutanée, une zone sera tondu au niveau du dos des animaux préalablement aux expositions.

Ils seront régulièrement observés durant les expositions, suivis quotidiennement au plan clinique et pesés plusieurs fois par semaine durant l'étude.

Les effets des expositions sur la respiration, la peau, les yeux, ainsi que sur les muqueuses seront particulièrement évalués.



En fonction des objectifs de chaque étude, qui seront définis par rapport au fumigène testé, les évaluations *in vivo* décrites dans les procédures 2, 3 et 5 seront réalisées en complément avant la mise à mort des animaux.

Pour la mise au point de l'évaluation de la mécanique pulmonaire de la procédure 5, différentes modalités d'essai seront testées pour définir les conditions expérimentales optimales. Un minimum de 10 et un maximum de 30 animaux (5 à 15 rats par type d'intubation) seront pour cela utilisés (Procédure 4).

Une démarche d'évaluation et de prise en charge de la douleur selon la nature et le degré de souffrance observé a été définie pour ce projet.

En cas de pathologie, un traitement médicamenteux adapté, n'interférant pas avec les objectifs de l'étude, pourra être administré (application locale de povidone iodée en cas de lésion cutanée, injection(s) sous-cutanée(s) de méloxicam 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, les animaux seront sédatisés par inhalation d'isoflurane, puis sacrifiés par injection intrapéritonéale d'une dose létale de pentobarbital.

Dans les procédures 4 et 5, un traitement antalgique (injection sous-cutanée de buprénorphine, ou traitement équivalent) sera administré préalablement à l'anesthésie des animaux (injection intrapéritonéale d'un mélange de kétamine et de xylazine). Les animaux seront ensuite intubés ou trachéotomisés, et un agent bloquant neuromusculaire potentiellement administré (injection intrapéritonéale de bromure de rocuronium, ou substance équivalente) pour la mesure de la mécanique pulmonaire.

Concernant la réduction, plusieurs paramètres biologiques seront évalués sur chaque animal, permettant ainsi de limiter le nombre de rats utilisés.

Concernant le choix de l'espèce animale, le projet suivra les recommandations des lignes directrices (LD) de l'OCDE n°403 et 436 pour l'évaluation de la toxicité aiguë par inhalation, d'utilisation du rat à l'âge jeune adulte et de souches communément utilisées en laboratoire.

Au plan du raffinement, les conditions d'hébergement des animaux seront enrichies pour favoriser leur bien-être.

Ils seront hébergés par sexe par lot expérimental à plusieurs par cage pour leur socialisation. 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 d'évaluer la toxicité aiguë de l'inhalation de fumées. Ce projet de recherche a néanmoins pour objectif de développer une méthodologie d'essai qui permettra de la limiter. Simultanément à l'exposition des animaux, des cultures cellulaires de peau, de cornée et de poumon seront exposées à l'interface air-liquide à ces mêmes fumées, et des corrélations entre les résultats *in vivo* et *in vitro* seront déterminées pour évaluer le potentiel prédictif des modèles *in vitro* pour ce type d'évaluation.

**20104** En raison de l'abondance croissante de nourriture, le régime occidental est constitué de presque 40 % de graisses, ce qui contribue grandement à l'augmentation de la fréquence de l'obésité et d'autres pathologies comme le diabète de type 2. Par ailleurs, il existe une attirance spontanée de l'homme pour les aliments riches en graisses et il est actuellement clairement établi que le goût du gras représente une sixième modalité gustative. Des études récentes effectuées chez l'homme comme chez la souris indiquent que l'obésité est associée à une altération du goût avec une préférence élevée pour les corps gras. Les récepteurs de lipides (CD36 et GPR120) exprimés au niveau de la langue sont responsables de ce phénomène. Ainsi ces deux récepteurs pourraient représenter une cible pour développer de nouvelles molécules permettant de moduler le

comportement alimentaire par rapport aux graisses chez les patients souffrant d'obésité. Ainsi, nous avons synthétisé de faux lipides capables d'interagir avec ces récepteurs. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'implication de CD36 linguale dans l'effet de ces molécules sur la préférence des aliments gras, la prise alimentaire et l'incidence de l'obésité induite par régime hyper-gras dans deux modèles souris :

1) souris C57/Bl6

2) souris n'exprimant pas CD36 dans les papilles gustatives « CD36 KO lingual ».

Cette demande fait suite au projet dont le but était de valider les effets de nos molécules dans différents modèles d'obésité. L'utilisation de souris CD36 KO lingual nous permettra maintenant de clairement déterminer l'importance de ce récepteur dans les effets de nos molécules. - Ainsi, nous utiliserons 120 souris mâles (fond génétique C57/Bl6) âgées de 4 à 6 semaines qui seront soumises soit à un régime alimentaire standard, soit à un régime alimentaire enrichi en graisses (contenant 32% d'huile de palme) pendant 16 semaines afin d'induire une obésité. Nous utiliserons des souris mâles, car il est connu que les souris femelles sont moins susceptibles de développer une obésité suite à un régime riche en gras. L'utilisation du modèle animal (souris) s'impose dans ce projet de par la nouveauté de nos molécules « faux lipides ». En effet, aucune étude clinique n'a pu être mise en place sans test préalable. De plus, le besoin d'analyser les mécanismes multifactoriels impliqués dans l'obésité fait que les approches *in vitro* ne sont pas suffisantes.

- Dans un souci de réduction et en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », les souris femelles CD36 KO linguale pourront être utilisées pour approfondir les études mécanistiques sur culture primaire de papilles gustatives. De plus, les souris auront à leur disposition divers éléments de raffinements (frisons et cabanes) et seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs ou le personnel qualifié des animaleries. Des points limites ont été définis selon le modèle expérimental, les régimes mis en oeuvre et les procédures réalisées. Le personnel qualifié pourra précocement détecter ces points limites et les animaux présentant un état général dégradé seront immédiatement retirés de l'étude. Avant chaque intervention pouvant induire de la douleur, les animaux seront anesthésiés. Aussi, Nous avons développé une lignée de cellules gustatives de souris qui permet de réaliser les études mécanistiques et ainsi limiter au maximum l'utilisation d'animaux. Enfin, le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre l'objectif scientifique du projet.

D'autre part, bien que notre intérêt principal concerne la perception du goût du gras et par conséquent les papilles gustatives, nous nous efforcerons de collecter tous les autres tissus métaboliques des animaux afin de mettre en place une banque d'organe nous permettant de mutualiser les échantillons et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaire pour de futurs projets ou des projets collaboratifs.

**20105** D'après l'OMS, les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde : il meurt chaque année plus de personnes en raison de maladies cardiovasculaires que de toute autre cause.

Les maladies cardiovasculaires constituent un ensemble de troubles affectant le cœur et les vaisseaux sanguins. Elles comprennent les maladies coronariennes, les maladies cérébrovasculaires, les cardiopathies rhumatismales et d'autres affections. La pathologie sous-jacente est l'athérosclérose, qui s'est développée sur de longues années et a généralement déjà atteint un stade avancé lorsque les symptômes se manifestent, habituellement en milieu de vie. Le développement de l'athérosclérose est accéléré en présence de certains facteurs de risque, parmi lesquels les taux élevés de cholestérol sanguin ou hypercholestérolémie.

Par conséquent, diminuer la concentration de cholestérol sanguin permet de réduire le risque de développement de maladie coronarienne. Aujourd'hui, toutes les recommandations publiées par les autorités de santé et sociétés scientifiques relatives à la gestion du cholestérol sanguin et du risque cardiovasculaire confirment que le LDL (Low Density Lipoprotein) -Cholestérol ou « mauvais

cholestérol » est la cible principale (pour plus d'informations : <https://doi.org/10.1001/jama.2016.13985>).

Il est bien établi qu'une réduction de la concentration sanguine de LDL-Cholestérol réduirait généralement le risque de développement de la maladie coronarienne. Dans la population générale, la promotion d'un mode de vie sain axé sur une alimentation équilibrée et une augmentation de l'activité physique est la première recommandation pour maintenir un taux de cholestérol sanguin normal. L'utilisation d'extraits végétaux en complément des mesures hygiéno-diététiques est également une piste sérieuse pour la lutte contre l'hypercholestérolémie. L'objectif de ce projet est d'étudier les bénéfices apportés par différentes formulations innovantes d'extraits végétaux sur la prévention et le développement de l'hypercholestérolémie dans le modèle de hamsters dyslipidémiques, et de mieux comprendre les mécanismes d'action de ces extraits végétaux en observant plus particulièrement leur effet sur l'absorption intestinale du cholestérol, sur la production des lipoprotéines hépatiques, et sur la dégradation enzymatique des lipides circulants dans le sang (pour plus d'informations : [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)41221-0](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)41221-0) et <https://doi.org/10.1194/jlr.D500019-JLR200> ).

Chez le hamster, les mécanismes moléculaires de régulation de l'homéostasie des lipoprotéines sont similaires à l'homme. Ainsi, les hamsters sont capables, comme chez l'Homme, de développer une hypercholestérolémie lorsqu'ils sont soumis à un régime nutritionnel enrichi en cholestérol. La pathologie se développe également rapidement dans ce modèle comparativement à d'autres modèles animaux plus susceptibles de ressentir de la douleur sur une plus grande période (PNH, Chien, mini-porc). Le hamster est donc un modèle de choix pour l'étude de l'hypercholestérolémie et il ne peut pas être remplacé par un modèle in-vitro.

Pour ce projet, 126 hamsters seront donc utilisés. Ce nombre est déterminé pour permettre de répondre aux objectifs en ayant recours à des effectifs les plus petits possible. Les hamsters seront placés dans un environnement adapté à leurs besoins physiologiques et observés quotidiennement pour prévenir au plus vite de la diminution de leur état de bien-être.

L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement (3R) de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

**20106** Parmi tous les organes, le cerveau est le plus vulnérable à l'hypoxie (baisse de l'oxygénation cérébrale) en raison de ses besoins élevés en oxygène et en énergie pour maintenir correctement ses fonctions. Chez l'Homme, des cas d'hypoxie sont signalés dans diverses affections cérébrales (accident vasculaire cérébral, traumatisme crânien, apnée du sommeil, etc.), mais restent impossibles à soigner. En revanche, les phoques ont la capacité exceptionnelle, grâce à des adaptations physiologiques, de maintenir l'intégrité des fonctions cognitives malgré l'hypoxie et l'hypothermie pendant la plongée profonde. C'est notamment le cas des éléphants de mer austraux (*Mirounga leonina*), qui effectuent des plongées jusqu'à 2000 m tout en restant immergés pendant 120 min. Or les capacités de plongées de l'éléphant de mer, en termes de réponses physiologiques au manque d'oxygène (hypoxie) et à l'hypothermie, restent inexplicables. Les éléphants de mer peuvent se permettre d'atteindre des niveaux d'oxygène sanguins très faibles en plongée qui seraient délétères pour la plupart des espèces. A de tels niveaux, de nombreuses fonctions physiologiques ne peuvent plus être assurées, alors que ceux-ci capturent leurs proies à de grandes profondeurs. Les adaptations physiologiques (hypothermie) et cérébrales (activité neuronale, vascularisation cérébrale) mises en place chez les éléphants de mer via leurs mécanismes de tolérance au manque d'oxygène pourraient aider à de nouvelles voies thérapeutiques.

Ce projet propose d'étudier et de mesurer la physiologie circulatoire, neurologique et tissulaire des éléphants de mer qui évoluent librement dans leur milieu. A notre connaissance, c'est la première approche au niveau international qui propose de mesurer simultanément plusieurs paramètres physiologiques, comportementaux et environnementaux dans des conditions in-situ.

Le projet se découpe en trois procédures : un total de 99 individus femelles au maximum seront capturés et suivis, puis relâchés libres après l'étude. Trois stades de développement sont

représentés : des jeunes sevrés (3 semaines), des juvéniles âgées de 8 mois à un an et des adultes (âge indéterminé).

63 individus (Procédure 1 : 21 jeunes sevrés, 21 juvéniles et 21 adultes) seront équipés d'enregistreurs externes (collés sur les poils, pour analyser les paramètres de plongées) et d'appareils internes (ECG: électrocardiogramme, fréquence cardiaque, enregistreur de température), puis laissés libres de mouvements et re-capturés (après 30 jours pour les jeunes et 3 mois pour les juvéniles et adultes). Les jeunes sevrés seront suivis et recapturés 4 fois sur la colonie pour pesées et suivis de composition corporelle.

24 individus (Procédure 2 : 12 jeunes sevrés, 12 juvéniles) seront équipés d'enregistreurs externes (collés sur les poils, EEG: électroencéphalogramme, activité cérébrale), puis laissés libres de mouvements et suivis pendant 40 jours. Ils seront capturés 4 fois et placés dans un bassin pour mesurer leurs réponses métaboliques aux plongées (chambre respiratoire, moins de 24 heures) au cours de leur développement. Leur activité cérébrale sera également suivie par mesure de spectroscopie infra-rouge.

12 individus (Procédure 3 : 6 subadultes et 6 adultes) seront capturés et placés dans une caisse pour être transportés à plusieurs dizaines de kilomètres de la côte (translocation) pour être, après équipement (enregistreurs externes, EEG, activité cérébrale), relâchés pour revenir à terre (plongées spontanées sur 3-4 jours), re-capturés et déséquipés. Tous les équipements se font sous anesthésie générale.

L'objectif étant d'étudier les éléphants de mer dans leur milieu naturel, ils ne peuvent être remplacés par une autre espèce, par des animaux d'élevage, ou encore par des expérimentations en captivité. La « règle des 3R » est toutefois appliquée, puisque le nombre d'animaux capturés est limité pour répondre aux objectifs, et que l'équipe sur le terrain met en place toutes les mesures nécessaires à la réduction du dérangement, du stress, ainsi que de l'éventuelle douleur des animaux.

Les animaux sont équipés depuis plusieurs années par l'équipe et les balises externes communément déployées sur les éléphants de mer n'impactent ni leur survie, ni leur succès de pêche. Nous estimons manipuler chaque année moins de 0,005 % de l'effectif total (hors jeunes de l'année) de la population d'éléphants de mer Kerguelen, et 0,018 % des femelles adultes.

**20107** La mastocytose est une maladie rare due le plus souvent à des mutations activantes d'un récepteur entraînant une prolifération aberrante de cellules immunitaires appelées mastocytes. La forme la plus grave de mastocytose est la mastocytose agressive, dans laquelle il y a formation de tumeurs de mastocytes dans de nombreux tissus et dans la moelle osseuse. Dans la plupart des cas, la survie des patients atteints de mastocytose agressive n'excède pas 3 à 5 ans après le diagnostic, et il n'existe pas à l'heure actuelle de solution thérapeutique satisfaisante dans cette pathologie.

Ce programme de recherche a pour but de développer de nouvelles approches d'immunothérapie dans la mastocytose. Devant la complexité de cette pathologie, due notamment à l'implication de différents organes, le recours aux modèles animaux est indispensable. L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire. Nous estimons devoir utiliser 1050 souris sur les 5 années que durera ce projet. Ce nombre inclut le nombre minimum nécessaire de contrôles et la nécessité de reproduire les résultats, en respect avec la règle des 3R. Le calcul du nombre minimal d'animaux par groupe a été fait sur la base de notre expérience antérieure avec les modèles d'immunothérapie et les données publiées sur des modèles murins de mastocytose. Les animaux seront observés quotidiennement. Tout animal présentant une douleur évidente (isolement, baisse importante de l'activité, perte de poids > 20%, pilo-érection) sera immédiatement mis à mort. Les résultats attendus des expériences que nous projetons de réaliser contribueront à mieux comprendre le développement de cette pathologie grave et à identifier de nouvelles approches d'immunothérapie pour soigner cette maladie.

Le projet impliquant une procédure de « classe sévère », le projet fera l'objet d'une appréciation rétrospective à l'issue de sa réalisation (en application de l'article R.214-120 du décret n°2013-118 du 1er février 2013).

**20108** Le projet de recherche proposé s'intéresse à l'initiation et la progression de la cancérogenèse pancréatique et gynécologique. Le cancer du pancréas est l'un des cancers les plus mortels et aucune thérapie efficace n'est disponible pour le moment. Les cancers ovariens non opérables sont très résistants et de mauvais pronostic. L'utilisation de lignées cancéreuses pancréatiques ou ovariennes humaines en culture ne nous permet pas de comprendre complètement cette pathologie. Ceci est en partie expliqué par le fait que les tumeurs solides sont composées de plusieurs types cellulaires en dehors des cellules tumorales qui jouent des rôles importants dans la progression du cancer. Afin de mettre en place des traitements plus efficaces, la communauté scientifique a ainsi développé des modèles murins de référence pour l'étude de ces cancers. Dans ces modèles, l'introduction dans l'ovaire ou le pancréas d'altérations génétiques à l'origine de ces cancers mime l'évolution de ces pathologies chez l'homme. Des modèles de cancers du pancréas et de l'ovaire reconstitués *in situ* après injection de cellules tumorales ou stromales sont également utilisés. Nous suivrons l'évolution des paramètres de la progression tumorale. Les cancers solides du pancréas et de l'ovaire sont en effet des maladies complexes très métastatiques, impliquant des cellules non tumorales. Il est démontré que ces cellules non tumorales composant le stroma jouent un rôle négatif dans la survie des patients.

Enfin, notre mode de vie actuel, l'alimentation ou les pathologies associées à ce mode de vie, le diabète, l'exposition aux contaminants environnementaux, la pancréatite ou l'obésité modifient l'incidence de ces cancers.

Seuls nos modèles murins nous permettront d'étudier la cinétique d'apparition et les étapes critiques de cette cancérogenèse, le rôle des cellules non tumorales, les interactions entre les cellules tumorales / stromales, le développement de métastases et l'importance des facteurs de risque associés. Nous voulons en particulier démontrer le rôle thérapeutique de l'inhibition génétique ou pharmacologique d'une cible majeure en oncologie. Cette étude nous permettra de valider cette voie ou un des composants particuliers comme cible thérapeutique. Le projet aboutira par des essais cliniques de Phase I/II pour des molécules déjà en cours de développement.

Ce projet comporte une expérimentation sur 4205 animaux. Nous travaillons dans le respect de la règle des 3 R. 1- Réduire : Les groupes d'animaux sont prévus afin de permettre des analyses statistiques concluantes (15 souris ou 8 souris par groupe en fonction du test réalisé) et éviter les duplications d'expériences. Nous prélevons le maximum de données par souris et d'organes que nous partageons avec des collaborateurs au niveau d'une banque d'échantillons. 2- Raffiner : L'hébergement des animaux est enrichi. Le bien-être animal sera évalué par observation quotidienne du comportement général. Tout animal souffrant sera traité ou euthanasié dans le respect des points limites. Nos procédures permettent la gestion de la douleur : nous utilisons une anesthésie et des anti-douleurs lors des procédures, et en cas de chirurgie, les soins et la surveillance post-opératoires sont intensifiées avec contrôle du maintien de la température corporelle, et une durée de convalescence d'un jour. Nous utilisons des techniques d'imagerie de pointe afin de raffiner nos expérimentations. Nos expérimentateurs sont formés en continu ce qui garantit la réalisation de gestes adéquats ; ces formations seront consignées dans le livret de compétence. Une évaluation rétrospective du projet sera réalisée pour réduire et raffiner les protocoles expérimentaux. 3- Remplacer : Nous créerons les lignées cellulaires à partir des animaux pour modéliser les conditions *in vitro* à l'aide de co-cultures et des techniques de bio-impression ou de micro-fluidique pour reconstituer le tissu.

**20109** La sélection des porcs est traditionnellement évaluée par la mesure de leurs performances de croissance lorsque les animaux reçoivent des aliments de bonne qualité leur permettant d'exprimer leur potentiel de croissance.

Dans un contexte de diversification des modes de production, des aliments contenant des matières premières plus difficiles à digérer, sont de plus en plus utilisés dans les élevages de production, notamment pour réduire le coût de production lié à l'alimentation.

L'efficacité digestive est donc une composante importante à évaluer pour disposer d'animaux mieux adaptés à ces systèmes. Une mesure de l'efficacité digestive utilisable en animalerie expérimentale

a donc été développée pour identifier des animaux digérant efficacement l'aliment. La méthode de mesure s'appuie sur l'analyse de la composition chimique des fèces des animaux.

L'objectif de la présente étude est d'évaluer la variabilité génétique de l'efficacité digestive dans deux populations porcines. Pour ce faire, nous contrôlerons 756 porcs de race Landrace et 756 porcs de race Piétrain selon les modalités d'élevage habituelles. Pour ces individus, un échantillon de fèces sera prélevé. Ces porcs seront élevés en groupe dans des conditions proches de celles rencontrées en élevage et leurs consommations d'aliments seront enregistrées à l'aide de distributeurs automatiques d'aliments.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement : les mesures sur animaux sont requises car l'objectif de l'étude est d'explorer l'intérêt d'un nouveau critère de sélection (l'efficacité digestive) et ses modalités de mise en œuvre pour lequel aucune donnée n'est disponible en routine dans les populations sélectionnées.

Réduction : A l'aune de travaux précédents, le nombre d'animaux a été calibré pour avoir une puissance statistique suffisante pour estimer les corrélations génétiques et phénotypiques de l'efficacité digestive avec les caractères de croissance et de consommation alimentaire enregistrés par ailleurs.

Raffinement : les méthodes de phénotypage développées permettent d'élever les animaux en groupe dans des conditions d'élevage normales et sont applicables à un prélèvement ponctuel de fèces par animal. Elles constituent donc un progrès important par rapport aux méthodes de mesure de référence qui requièrent l'élevage des porcs en loge individuelle. Par ailleurs, toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté.

**20110** Titre : Reprogrammer les cellules gliales de l'hippocampe de souris en neurones induits glutamatergiques, une nouvelle stratégie thérapeutique afin de réduire les déficits de mémoire dans le cadre des tauopathies

Durée : 60 mois

Mots clés : reprogrammation cellulaire ; médecine régénérative

Finalité : Recherche fondamentale, Recherche translationnelle et appliquée

Objectifs et bénéfices escomptés :

Le terme tauopathie englobe une famille de maladies caractérisées par l'agrégation de la protéine Tau à l'intérieur des neurones, entraînant la mort de ces neurones et l'apparition de déficits cognitifs. La maladie d'Alzheimer est la tauopathie la plus courante. Elle touche actuellement plus d'un million de personnes en France tandis que plus de 200 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année. Ceci, associé au fait qu'il n'existe actuellement aucun traitement curatif, fait de la maladie un enjeu de santé publique majeur. Il y a donc un fort besoin pour le développement de nouvelles thérapies.

Le présent projet a pour but d'évaluer une nouvelle stratégie thérapeutique pour les tauopathies, la reprogrammation cellulaire, visant à remplacer ces neurones perdus par d'autres générés in situ. La reprogrammation cellulaire consiste en la conversion des cellules gliales (non-neuronales) du cerveau en nouveaux neurones « induits », dans le but que ceux-ci s'intègrent dans les réseaux de neurones endogènes, participent aux fonctions cognitives et réduisent les déficits. Cette stratégie de reprogrammation cellulaire a déjà été utilisée avec succès dans plusieurs modèles rongeurs de maladies, permettant une amélioration fonctionnelle dans des modèles d'ischémie, de maladie de Parkinson et d'épilepsie. Avec ce projet, nous espérons démontrer que la reprogrammation cellulaire peut également être utilisée pour traiter les pertes de mémoire dans le cadre des tauopathies du type de la maladie d'Alzheimer.

Nuisances prévues :

Ce projet, d'une durée de 5 ans, amènera à l'utilisation de 984 souris impliquées dans 4 procédures de sévérité modérée.

(1) Pour modéliser la perte de neurones, des souris recevront une injection intracérébrale de virus exprimant la protéine Tau ou de kaïnate. Un groupe d'animaux sera alors sacrifié afin de réaliser une première expérience dont le but sera de déterminer quel est le moment le plus adéquat, dans le développement de la pathologie, pour appliquer notre stratégie de reprogrammation. (2) Dans un deuxième temps, les animaux lésés seront réopérés afin d'injecter dans leur cerveau des facteurs induisant la reprogrammation des glies en neurones. Les animaux seront sacrifiés à différents temps après la deuxième chirurgie pour déterminer la proportion des glies ayant été reprogrammées en neurones et pour déterminer si les nouveaux neurones induits présentent des caractéristiques similaires à celles des neurones perdus. (3) Dans une 3ème série d'expériences visant à étudier l'intégration des neurones induits, les animaux ayant reçu les facteurs de reprogrammation seront à nouveau opérés pour injecter un virus fluorescent permettant de visualiser les connexions entre les neurones induits et les neurones endogènes du cerveau. Les animaux seront alors sacrifiés afin de réaliser les analyses permettant de mesurer le niveau de connexion des neurones induits. (4) Dans une 4ème expérience, nous étudierons l'implication des neurones induits dans la mémoire et s'ils sont capables de réduire les déficits observés chez les animaux. Pour ce faire, nous utiliserons une technique permettant de stimuler les neurones induits par la lumière, afin de les rendre actifs. Nous étudierons alors l'effet de cette stimulation sur le comportement des animaux durant une tâche impliquant la mémoire. Pour cela, les animaux seront opérés plusieurs semaines après l'injection des facteurs de reprogrammation afin de placer un implant permettant de délivrer la lumière directement dans la zone du cerveau où sont localisés les neurones induits. Les animaux seront ensuite placés dans une enceinte permettant de tester leur mémoire et nous étudierons leur comportement en absence ou avec une stimulation lumineuse. Cette stimulation n'est pas douloureuse et les animaux seront habitués au préalable à la procédure pour éviter tout stress. A la fin de ces expériences, les animaux seront sacrifiés pour réaliser les différentes analyses permettant de confirmer que les neurones induits ont bien été activés et sont impliqués dans le comportement. Toutes les chirurgies seront pratiquées sous anesthésie générale et analgésie locale renforcée et les animaux recevront des antalgiques en post-opératoire afin de s'assurer que ces procédures n'entraînent aucune douleur. Par ailleurs, nous nous assurerons que les animaux ont complètement récupéré de la première chirurgie avant de les réopérer.

Application de la règle des 3 R :

Remplacement : Des modèles basés sur la culture de neurones *in vitro* existent. Cependant, l'environnement cérébral, dont la complexité ne peut pas être reproduite *in vitro*, a un impact sur la reprogrammation glie-neurone. De plus, notre étude nécessite de corrélérer des données observées à l'intérieur du cerveau des souris avec une amélioration du comportement. L'utilisation d'un modèle animal reste donc incontournable. La souris est l'espèce la plus adéquate pour ce projet notamment parce qu'elle est particulièrement adaptée à l'étude de la mémoire.

Réduction : Toutes les expérimentations sont planifiées avec le nombre minimal d'animaux nécessaires pour garantir une pertinence statistique. Afin de réduire le nombre d'animaux, nous avons choisi d'effectuer une première sélection des facteurs de reprogrammation *in vitro*. Toujours dans un souci de réduction, nous réaliserons plusieurs conditions expérimentales sur un même groupe de souris quand cela est possible.

Raffinement : Les procédures chirurgicales pouvant s'accompagner d'une douleur modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur/souffrance/angoisse ressentie par les animaux. Toutes les chirurgies seront pratiquées sous anesthésie générale et analgésie locale renforcée. Pour éviter toute douleur dans les jours suivant la chirurgie, les animaux recevront aussi un traitement analgésique post-opératoire. Nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences, et de manière accrue en post-opératoire, afin de pouvoir intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de douleur/angoisse. Une grille d'évaluation adaptée à l'étude nous permettra de déterminer des critères d'arrêt précoces des expériences afin d'éviter toute souffrance aux animaux.

**20111** Les composés perfluorés sont très persistants conduisant à une exposition importante des populations humaines. Les études épidémiologiques suggèrent un lien entre une exposition à ce type de composés pendant la grossesse et des perturbations de la fonction thyroïdienne, de la reproduction du métabolisme et, un retard de croissance du fœtus. Ces résultats suggèrent que les fonctions du placenta, un organe essentiel pour assurer le lien entre la mère et le fœtus, pourraient être affectées. Du fait de sa très longue persistance dans l'environnement et de sa capacité à s'accumuler le long de la chaîne trophique, l'acide perfluorooctane sulfonique (PFOS), un composé perfluoré qui a été très largement utilisé, constitue un contaminant important de la chaîne alimentaire et de l'eau. Nous évaluerons chez la souris gestante l'impact de l'exposition au PFOS administré dans l'eau de boisson sur la structure et les fonctions placentaires. Pour bien caractériser les effets sur la détoxification et le métabolisme placentaires, les différentes procédures seront réalisées chez des souris « normales » et des souris génétiquement modifiées n'exprimant plus deux types de récepteurs nucléaires ayant un rôle déterminant pour ces deux processus, les récepteurs CAR (souris CAR<sup>-/-</sup>) et PXR (souris PXR<sup>-/-</sup>). Les expériences seront réalisées sur des souris en hébergement collectif (12 souris par cage). Elles bénéficieront d'un enrichissement du milieu sous forme de maisonnettes en Inox, dispositif de nidification et mise à disposition de papier et carton. La détection précoce de signes de toxicité générale sera assurée par une surveillance journalière, des pesées régulières des animaux et la mesure de la prise alimentaire et l'abreuvement (détection d'un problème d'appétence). Pour limiter le stress du au mode d'administration, le PFOS sera administré incorporé dans l'eau de boisson plutôt que par gavage. Les animaux recevront une faible dose sans toxicité générale et bien inférieure à la dose maximale sans effet définie réglementairement mais permettant de reproduire des niveaux de concentrations plasmatiques similaires à ceux décrits chez la femme enceinte. Afin de préciser ces doses, une première étude pharmacocinétique sera réalisée. Ce type d'approche requiert de mesurer les concentrations du toxique dans le sang à 12 temps différents après l'administration du produit. Cette expérience doit être faite pour une administration intraveineuse et une administration dans de l'eau. La très grande persistance du PFOS dans l'organisme nécessite un suivi des concentrations sur 120 jours après l'administration. Le volume de plasma requis pour le dosage de PFOS est trop important pour autoriser plusieurs prélèvements sur le même animal. Les prélèvements de sang seront réalisés par ponction cardiaque sous anesthésie générale gazeuse. Les données seront traitées par modélisation mathématique, une approche permettant de travailler avec un nombre limité de données pour chaque point réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires. Au total 252 souris incluant des souris sentinelles (suivi de la contamination environnementale au PFOS au cours de l'expérimentation) et des souris satellites (pallier des pertes éventuelles) dans chaque groupe.

Une fois déterminée la dose à administrer, des souris femelles de chaque génotype seront abreuvées avec soit de l'eau non traitée ou de l'eau contenant du PFOS à la dose déterminée dans la première expérience et ce, de la puberté jusqu'à la fin de l'expérimentation. A l'âge adulte (10 semaines), les souris seront mises à la reproduction. Les évaluations et collectes de tissu seront faites post-mortem à 5 (début de formation du placenta) et 15 jours (placenta achevé) de gestation après une collecte de sang par ponction cardiaque sous anesthésie gazeuse poussée. Les échantillons tissulaires d'un même animal seront divisés en deux fractions afin de pouvoir réaliser sur le même échantillon des analyses histologiques et des analyses moléculaires. Afin d'atteindre une puissance de 0.8 dans nos tests statistiques, l'effectif final requis est de 10 souris gestantes par traitement/période/génotype. Afin de pallier de possibles échecs de mise à la reproduction et/ou pertes 2 souris satellites seront ajoutées à chaque lot, au total 12 souris seront mises à la reproduction pour chaque génotype (3) x traitement (2) x période (2). Au bilan, 144 souris femelles seront impliquées.

Afin de déterminer si le PFOS altère la capacité du placenta à transférer au fœtus des hormones thyroïdiennes de la mère une étude pharmacocinétique de l'hormone thyroïdienne la thyroxine (T4), basée sur le décours temporel des concentrations en T4 dans le sang des mères et l'unité fœto-placentaire sera réalisée à une période à laquelle le placenta est pleinement fonctionnel. Des souris gestantes traitées ou non traitées au PFOS seront sacrifiées à 15 jours de gestation. Une



même souris ne sera prélevée qu'une fois. Pour permettre la modélisation mathématique, 3 données donc 3 souris sont nécessaires pour chaque temps. Six temps de prélèvement sont nécessaires pour suivre la thyroxine après une administration unique par voie intrapéritonéale de T4 (3 souris x 6 temps x 2 traitements x 3 génotypes = 108 souris au total, plus 18 satellites (3 souris x traitement (2) x génotype (3) ) soit au total 126 souris. Le sang sera prélevé par ponction cardiaque sous anesthésie gazeuse poussée

**20112** Les muscles squelettiques ont pour fonction d'assurer la motricité du corps dans son environnement, en permettant de faire bouger le squelette de manière volontaire. Ils sont composés de fibres multinuclées formées au cours du développement par la fusion de nombreuses cellules appelées myoblastes. Chez l'adulte, après avoir été lésées (en cas de maladie, après une blessure), les fibres musculaires peuvent régénérer à partir de cellules souches musculaires: les cellules satellites, qui vont être activées, donner de nouveaux myoblastes qui vont alors fusionner avec les fibres lésées ou bien former de nouvelles fibres musculaires multinuclées. Nous avons identifié *in vitro* des molécules capables de contrôler l'étape de fusion pour éviter que celle-ci ait lieu de façon anarchique et conduise à la formation des muscles dont la fonction serait altérée. Ce projet vise à mieux comprendre l'étape de fusion lors de la formation des fibres musculaires et aussi l'implication de certaines protéines présentes à la surface des cellules musculaires lors de la régénération du muscle. Une bonne compréhension des mécanismes de la fusion des cellules musculaires et de la régénération musculaire est primordiale notamment afin d'envisager d'améliorer les thérapies en cas de myopathies ou de lésions musculaires importantes liées à un accident ou à l'âge par exemple. Pour mener à bien ce projet, afin de limiter le nombre de souris utilisées, nous réalisons une grande partie de nos expériences *in vitro*, en utilisant des cellules musculaires. Cependant les approches *in vitro* ne permettent pas d'étudier les aspects physiologiques de la fusion des cellules musculaires et la relation avec le microenvironnement. L'expérimentation sur des souris est donc indispensable dans la mesure où, par définition, la régénération musculaire ne peut être étudiée qu'*in vivo*. Aucune méthode de remplacement permettant d'éviter le recours à l'expérimentation animale n'est disponible pour cet aspect du projet. Nous disposons d'une animalerie dans laquelle les souris sont surveillées quotidiennement. Afin de réduire au maximum la douleur et le stress, les animaux disposent d'un accès sans restriction à la nourriture et à la boisson et d'un environnement enrichi. De plus, tout acte supérieur en contrainte ou en douleur à une injection IP d'anesthésique est réalisé sous anesthésie. Les procédures que nous utilisons pour induire la régénération n'entraînent pas la mort des animaux mais seulement une atteinte des muscles étudiés et sont réalisées afin de limiter au maximum la souffrance des animaux. Pour ce projet nous estimons à environ 116 le nombre de souris que nous utiliserons.

**20113** Le syndrome de Meier-Gorlin (MGS) est une maladie rare (1 naissance sur 1000000) caractérisée par un défaut de croissance in utero et post-natal aboutissant à une petite taille, de petites oreilles et à de petites rotules ou leur absence. A cette triade clinique s'ajoute un large spectre d'autres anomalies, notamment des défauts du squelette incluant des os plus fins, une déformation de l'articulation du genou ou encore une minéralisation ralentie des os. Ce syndrome a été décrit pour la première fois en 1959 mais ce n'est qu'en 2011 qu'en sont identifiées les causes moléculaires, ce qui a permis le diagnostic moléculaire d'une centaine de patients dans le monde, dont 28 en France. Des mutations dans les gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus de duplication de l'ADN sont à l'origine de ce syndrome. Parmi ces mutations certaines sont plus fréquentes. Une mutation génétique particulière entraîne un défaut de la minéralisation de l'os chez la souris et des taux anormaux dans le sang de composés associés au remodelage de l'os, ce qui reproduit certains signes cliniques observés chez les patients atteints du syndrome. Il apparaît donc nécessaire de mieux comprendre les conséquences phénotypiques de cette mutation dans le modèle *in vivo*, qui récapitule des défauts chez les patients, et plus particulièrement les conséquences au niveau de la composition chimique de l'os, et de la formation et du remodelage de l'os. Dans ce cadre, les objectifs du projet sont de mieux comprendre les mécanismes mis en

jeu dans le développement et la croissance de l'os et les conséquences biologiques, cellulaires et moléculaires de la mutation en utilisant un modèle murin codant la protéine mutée. Sur une période de 3 ans, 48 animaux seront nécessaires de manière à étudier la biologie de l'os. Pour cela nous injecterons une substance (molécules fluorescentes) et utiliserons une technique non invasive, la technique de radiographie par Faxitron, sur des animaux placés sous anesthésie générale. Cette technique, basée sur les rayons X, permettra d'obtenir des images haute résolution de l'os, facilitant les mesures et la visualisation d'anomalies de l'os.

Ce projet sera mené dans le respect des règles des 3R :

**Réduction** : Toutes les procédures du projet sont réalisées sur les mêmes lots d'animaux et notamment par l'utilisation d'une technique non invasive, la radiographie par Faxitron, sur des animaux placés sous anesthésie générale. A partir d'une première analyse phénotypique, nous avons estimé le nombre optimal d'animaux par lot permettant de réaliser des tests statistiques fiables et obtenir des résultats scientifiques robustes.

**Raffinement** : Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et seront maintenus en groupes sociaux. Le milieu sera enrichi par des tubes de carton. Plusieurs points limites sont mis en place dans le but d'identifier une éventuelle souffrance des animaux et de les mettre à mort de manière anticipée si nécessaire. **Remplacement** : Les modèles cellulaires ne permettent pas de récapituler les processus impliqués dans la morphogenèse osseuse, la chronologie des processus développementaux et les interactions des cellules osseuses avec leur environnement et les autres tissus, ainsi que d'analyser la structure 3D de l'os. Le recours à l'animal est donc nécessaire.

La réalisation de ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu dans le développement et la croissance de l'os, et permettra d'apporter un éclairage nouveau sur l'origine des signes cliniques des patients atteints de MGS.

**20114** /\*L'ostéosarcome est une tumeur osseuse maligne qui affecte principalement les adolescents et les adultes jeunes. Le traitement classique comprend une chirurgie agressive des lésions tumorales osseuses (c. à d. avec amputation), associée à une chimiothérapie. Environ 15 à 20 % des patients porteurs d'ostéosarcome se présentent avec une maladie métastatique d'emblée, les métastases pulmonaires étant les plus fréquentes. Vingt cinq à 50% des patients développent des métastases ultérieurement. Malgré les récents progrès des polychimiothérapies, les patients présentant un ostéosarcome métastatique ont une survie à long terme inférieure à 20%.

Notre laboratoire s'intéresse au rôle dans les cellules osseuses d'un processus cellulaire appelé autophagie. Ce processus sert normalement à l'élimination du matériel cellulaire endommagé mais il peut également jouer un rôle dans certains processus de sécrétion et donc participer à la création du microenvironnement. Le but de ce projet est d'analyser la contribution de l'autophagie dans le dialogue entre l'ostéosarcome et le microenvironnement osseux.

Ce projet devrait permettre de mieux comprendre les interactions entre la tumeur et le microenvironnement et, à terme, d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques, ciblant non plus la tumeur mais la niche tumorale (c. à d. le microenvironnement).

Pour satisfaire au remplacement, une première phase du travail est réalisée *in vitro*. Cependant, il n'existe à ce jour pas de méthode alternative à l'animal permettant de réaliser la suite de ces études. Nous veillerons donc à utiliser un nombre d'animaux le plus restreint possible en fonction des besoins statistiques. Pour des raisons pratiques, les expériences prévoyant 30 animaux (ou plus) seront réalisées en 2 fois. Dans un but de réduction, si la première expérience nous permet déjà d'obtenir des résultats significatifs, la seconde ne sera pas réalisée, ce qui nous permettra de réduire le nombre de souris utilisées. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique, et les personnes réalisant les différentes procédures respecteront les règles d'éthique lors des manipulations et sacrifices des animaux. Nous sommes particulièrement sensibilisés au bien être des souris, et en particulier à la douleur potentiellement occasionnée au cours de l'expérimentation. Lors du suivi quotidien, nous utiliserons 3 critères : (i) L'apparence physique, et en particulier l'appui sur la patte injectée, (ii) La

perte de poids (iii) L'évolution de la taille de la tumeur. Nous utiliserons des antalgiques de palier 3 tels que buprénorphine de façon systématique et tout au long de la durée de l'étude. Dans ce cadre, nous avons précédemment optimisé la prise orale volontaire de buprénorphine par les animaux afin de diminuer le stress lié à des injections quotidiennes. Cette étude utilisera 215 souris sur 5 ans.

**20115** Ce projet vise à identifier le rôle de la minipuberté dans la mise en place des structures nerveuses impliquées dans la reproduction femelle. La minipuberté est une période postnatale pendant laquelle l'ovaire s'active. Or, jusqu'à présent le rôle et les conséquences de cette activation précoce et transitoire, qui existe également chez l'espèce humaine et qui précède de loin l'initiation de la puberté, sont encore mal connus. En effet, si la différenciation sexuelle du système nerveux central mâle et le rôle des hormones sexuelles dans cette différenciation sont étudiés depuis un demi-siècle, peu de choses sont connues chez la femelle. Les connaissances générées par ce projet peuvent participer à mieux cerner la période développementale pendant laquelle le système nerveux central femelle reçoit des informations périphériques, notamment par l'ovaire. Au delà de son application dans le domaine de la reproduction et la fertilité, les résultats obtenus permettraient également d'appréhender d'autres thématiques puisque les hormones ovariennes jouent des rôles importants dans un certain nombre de fonctions centrales qui dépassent la simple régulation de la reproduction.

Il s'agira donc d'interférer avec la production ovarienne en hormones pendant la période de minipuberté, par un traitement pharmacologique, et de mesurer les conséquences de cette perturbation ainsi que de la supplémentation séparée en hormones ovariennes sur la reproduction femelle. Pour cela, un effectif total de 75 souris femelles sera analysé à l'âge adulte dans des tests comportementaux.

Les souris sont élevées dans les conditions habituelles de l'animalerie (température et hygrométrie contrôlées) avec accès ad libitum à de l'eau et de la nourriture dans des cages enrichies avec un nid végétal. De plus, ces tests se font pendant la phase obscure, respectant la phase d'activité des souris, et sont filmés en lumière rouge afin d'interférer le moins possible avec le comportement des animaux.

Le design expérimental a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacer : il n'est pas possible de transposer les études comportementales *in vitro* ou *in silico* car il faut étudier les réactions de l'organisme en entier, Réduire : le nombre d'animaux a été calculé au plus juste pour garantir la puissance statistique de l'étude, enfin Raffiner : les protocoles sont élaborés dans le respect du bien-être animal, notamment en prenant en charge tout inconfort des animaux (enrichissement, analgésie adaptée, points limites).

**20116** Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de modèles d'endométriose chez les rongeurs afin de tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'endométriose est une maladie gynécologique chronique qui se caractérise par la présence, en dehors de l'utérus, de cellules issues de la muqueuse utérine (endomètre). Cette maladie touche 1 femme sur 10 en âge de procréer et peut se manifester dès l'adolescence. Elle peut être à l'origine de douleurs souvent invalidantes, majoritairement au niveau du pelvis, et de problèmes d'infertilité. Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer l'apparition de la maladie. La plus répandue étant la théorie des menstruations rétrogrades selon laquelle le sang des règles remonterait par les trompes utérines et libérerait des morceaux d'endomètre dans la cavité péritonéale, colonisant les organes environnants. Mais il existerait des femmes atteintes d'endométriose sans menstruations rétrogrades. Donc, d'autres hypothèses sont avancées, comme celle d'un système immunitaire défaillant, d'un problème génétique, moléculaire etc.... Actuellement, aucune théorie ne permet d'expliquer à elle seule cette maladie multifactorielle. Le diagnostic de l'endométriose est complexe et intervient parfois tardivement, en moyenne 7 ans après le début des symptômes. Cela est lié d'une part à la méconnaissance de la maladie et d'autre part à l'hétérogénéité des symptômes qui peuvent parfois être trompeurs (diarrhée, douleurs pelviennes liées au cycle menstruel, etc...).

Aujourd'hui, il n'existe aucun traitement pour guérir de l'endométriose. La prise en charge de la maladie passe par l'hormonothérapie, visant à mettre le corps dans un repos hormonal plus ou moins important mais dont les effets indésirables graves ont été rapportés par plusieurs études (risque accru de cancer du sein et de l'utérus, et de maladies cardiovasculaires, etc.), et la chirurgie inévitable à terme, accompagnée d'effets secondaires souvent lourds et une forte atteinte à la qualité de vie des patientes.

En raison de l'étiologie largement méconnue de la pathologie, il est nécessaire de conduire une recherche préclinique afin de développer et optimiser un modèle animal pour permettre la réalisation de tests précliniques sur ce modèle visant à mieux connaître la ou les origine(s) de la maladie, son évolution, d'identifier les mécanismes impliqués et d'évaluer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

La recherche menée *in vitro* (remplacement) sur des biopsies a permis de déterminer certains marqueurs biologiques et facteurs génétiques impliqués, de comprendre la nature des lésions et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Mais outre, le fait que les études *in vitro* nécessitent de grands nombres d'échantillons de biopsies humaines, elles ne permettent pas l'étude des interactions systémiques. A ce titre, les modèles animaux sont essentiels pour interroger l'organisme entier afin de mieux connaître et comprendre la physiopathologie de l'endométriose et ainsi identifier de nouveaux traitements de la maladie. Comme dans beaucoup d'autres domaines de recherche, les rats et les souris sont les modèles les plus utilisés. Mais, les rongeurs n'ont pas de menstruations et donc l'endométriose ne se crée pas spontanément. En effet, l'endométriose spontanée ne s'observe que chez les humains et chez certains primates. Ainsi, les primates non-humains demeurent le modèle le plus pertinent physiologiquement et anatomiquement pour l'étude de l'endométriose. Il est possible cependant de recréer en laboratoire l'endométriose chez les rongeurs afin de réduire l'utilisation des gros animaux (remplacement). Le modèle autologue, qui consiste à injecter ou à greffer dans la cavité abdominale de tissus d'endomètre préparés du même animal ou d'un autre animal du même fond génétique dit donneur, est le modèle chez les rongeurs le plus proche aujourd'hui de ce que l'on observe chez la femme.

Du fait des connaissances des procédures liées au projet et de l'expérience du personnel y participant, il est possible de réduire au minimum (réduction) le nombre d'animaux inclus par groupe de traitement à n=14 pour réaliser des tests statistiques suffisants, soit un nombre total de n=1050 animaux pour l'intégralité du projet sur 5 ans.

Les animaux seront hébergés par 2 lorsque possible, afin de favoriser leur interaction sociale ou hébergé individuellement avec de la boisson et de la nourriture ad libitum et l'ajout d'un enrichissement sous forme de papier ou de coton pour lui permettre de nicher (raffinement) afin réduire leur stress.

De plus, des protocoles d'anesthésie et d'antalgie adaptés à la sévérité des procédures expérimentales seront suivis assidûment. Enfin, un suivi systématique de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal.

## **20117** I-Contexte scientifique

Les glandes surrénales sont des organes endocriniens se situant au-dessus du rein et sont responsables de la synthèse d'hormones impliquées dans la régulation de nombreux processus physiologiques. Ainsi, l'aldostérone est responsable de la régulation de la tension artérielle tandis que le cortisol est impliqué dans l'axe de réponse au stress, le métabolisme et l'immunité. Au cours des dernières années, de nombreuses études se sont intéressées au rôle des cellules immunitaires (ou leucocytes) dans le fonctionnement des organes endocriniens. De manière surprenante, le rôle des leucocytes surrénaux, notamment des macrophages, reste inconnu. Les macrophages possèdent de nombreux rôles abondamment décrits dans la littérature scientifique comme l'internalisation et la dégradation des pathogènes ou des cellules mortes (phagocytose). Dans les organes endocriniens comme le pancréas, les macrophages permettent la gestion de l'insuline tandis que dans les testicules, ils aident d'autres cellules à produire de la testostérone. En outre, des études épidémiologiques ont montré un dimorphisme sexuel important dans l'incidence des

pathologies auto-immunes surrénaliennes comme la maladie d'Addison qui touche principalement les femmes.

## II-Problématique

Considérant le rôle des macrophages dans le fonctionnement des organes endocriniens, nous souhaiterions caractériser les leucocytes surrénaliens, en particulier les macrophages, et comprendre quelles peuvent être leurs fonctions. Nos résultats préliminaires ont montré un dimorphisme important quant à la position et les caractéristiques des macrophages surrénaliens entre les souris mâles et femelles. Le mécanisme cellulaire à l'origine de ce dimorphisme reste inconnu, tout comme le rôle de ces macrophages dans la physiologie de la glande surrénale.

## III-Hypothèse de travail

Nous allons étudier les caractéristiques et le(s) rôle(s) des macrophages surrénaliens en portant une attention particulière aux différences entre les deux sexes. Pour cela, nous étudierons des modèles de souris génétiquement modifiées qui nous permettront de suivre la localisation des macrophages dans la glande surrénale. Différents protocoles nous permettront d'investiguer en détail la fonction de ces macrophages (réponse immunitaire, phagocytose, rôle dans le fonctionnement de l'organe). Considérant le rôle de la glande surrénale dans la réponse au stress, différents protocoles induisant un stress aigu ou chronique seront appliqués à des souris auxquelles nous aurons potentiellement déplété les macrophages ou les monocytes afin de comprendre comment ils participent à l'axe de réponse au stress.

## IV-Avantages du projet

Le projet présente comme avantages d'être basé sur une caractérisation fine de la composition en cellules immunitaires de la glande surrénale chez des souris sauvages. Nous détenons dans notre élevage les souris transgéniques nécessaires pour répondre à nos autres questions. L'ensemble des techniques d'extraction et d'analyse des cellules immunitaires surrénaliennes sont parfaitement maîtrisées, nous permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés à son strict minimum afin de mener à bien notre étude.

## V-Nombre d'animaux nécessaires et espèce

Les animaux utilisés seront des souris (*Mus musculus*). Pour l'ensemble du projet, nous estimons qu'il nous faudrait environ 764 spécimens. L'utilisation de ce modèle est justifiée par l'impossibilité de travailler *in vitro* sur un organe entier comme la glande surrénale. De plus, la complexité du fonctionnement de l'axe hypothalamo-hypophysosurrénalien ne permet pas de mettre en place un modèle d'étude alternatif à la souris. La souris étant un mammifère, elle se trouve suffisamment proche phylogénétiquement parlant de l'Homme pour étudier les interactions entre macrophages et glande surrénale et les transposer à l'humain. Les procédures proposées sont basées sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. L'étude s'intéressant au dimorphisme sexuel, les 764 spécimens utilisés correspondront pour moitié à des mâles et pour l'autre moitié à des femelles.

## VI- Stratégie des 3R

### 1-Réduction

La maîtrise des outils d'investigation et d'analyse des macrophages surrénaliens nous permettra de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à notre étude, les protocoles étant déjà optimisés. Une méthodologie statistique rigoureuse nous permettra de prévoir le nombre minimum d'animaux nécessaires pour répondre aux questions de notre étude. De plus, nous incluons dans notre étude le facteur "sexe" en utilisant aussi bien des souris mâles que femelles. L'élevage de nos souris génétiquement modifiées se fait de manière à générer 100% de souris dont le génotype correspond à nos besoins expérimentaux et nous ne générerons aucune souris surnuméraire. En outre, bien que notre étude porte sur l'analyse des glandes surrénales, différents organes seront prélevés et analysés (Moelle osseuse, rate, tissu adipeux) ce qui nous permettra de caractériser en détail les différents modèles sans devoir réaliser le même protocole a posteriori.

### 2-Remplacement

Dans un souci de remplacement, de la culture cellulaire à partir de cellules primaires sera réalisée quand cela nous sera possible. Bien que difficilement réalisable car dépendant de nombreux facteurs et moins physiologique, nous optimisons actuellement un protocole de culture de macrophages surrenaliens primaires. De la même façon, nous essayons actuellement de développer à partir de cellules souches primaires de surrenale des "pseudo-organes" dit organoïdes servant de modèle d'étude *in vitro*. Bien qu'imparfait, ce modèle offre une approche complémentaire.

3-Raffinement  
La mise en place de points limites régissant le déroulement des procédures permet l'amélioration du bien-être animal afin de diminuer de façon optimale la détresse ou l'angoisse des animaux. Pour chaque procédure, nous avons prévu des mesures adaptées permettant la gestion de la souffrance, l'angoisse et de la douleur pour nos animaux. Les cages contiennent de la litière permettant d'éviter le contact avec le plastique et sont enrichies avec un abri en plastique et du matériel de nidification. Les animaux auront libre accès à de l'eau qui pourra être gélifiée en cas de besoin et à de la nourriture ad libitum.

#### VII- Perspectives

Comprendre le rôle que peuvent avoir les macrophages dans le fonctionnement de la glande surrenale offre la perspective de pouvoir modifier leur fonctionnement et ainsi agir sur la survenue de pathologies auto-immunes par exemple.

**20118** La prévalence des maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète est un problème actuel de santé publique dans les sociétés modernes humaines. Le diabète est caractérisé par une concentration circulante anormalement élevée de glucose. Les conséquences néfastes du diabète passent notamment par les réactions inévitables entre glucose et protéines, perturbant la conformation et le fonctionnement optimal de ces dernières. Ces réactions de glycation font partie des processus associés à un vieillissement accéléré de l'organisme. Etonnamment, certaines espèces animales présentent une glycémie chronique de type « diabète » mais sans en subir de conséquences néfastes apparentes, ou en étant caractérisées par des longévités paradoxales. Les oiseaux sont décrits comme tels.

Le projet de recherche proposé s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche de 4 ans, visant à décrire de manière exhaustive les glycations au sein du phylum des oiseaux, et à déterminer par une approche omique leur supposée résistance aux glycations. La présente demande concerne une approche expérimentale de ce projet, l'objectif principal étant de déterminer expérimentalement si une diète enrichie en glucose ou en un dérivé des réactions de glycation, le méthylglyoxal induit des effets pro-vieillessement chez un oiseau captif.

Pour atteindre cet objectif, nous effectuerons tout d'abord une courte étude pilote visant à évaluer sur un groupe restreint d'oiseaux (n=18) les effets plasmatiques de différentes doses de glucose et méthylglyoxal. Une fois la dose expérimentale déterminée, le projet sera réalisé en accord avec la règle des 3R. Nous allons utiliser 90 individus répartis en 3 groupes de 30 individus chacun (Contrôle, High glucose, Methylglyoxal), afin d'avoir une puissance de test statistique satisfaisante tout en réduisant le nombre d'animaux impliqués dans l'expérience ; de plus une partie des animaux sera utilisée à la fois dans l'étude pilote et l'étude finale (=Réduction). Pour l'enrichissement des cages nous utiliserons des perchoirs et branchages naturels (=Raffinement). Enfin, les expériences sur la résistance aux glycations nécessitent une approche physiologique qui ne peut être réalisée que chez l'animal vivant, mais nous utiliserons des animaux issus de la population maintenue dans l'animalerie du laboratoire ou en provenance d'un laboratoire partenaire (=Remplacement). Toute manipulation des animaux seront réalisées dans le calme, par ou sous la direction de chercheurs ayant une grande expérience de la manipulation des animaux et en particulier de cette espèce en captivité (>15 ans). Le point d'arrêt de la manipulation est fixé à l'apparition de polypnée, qui conduira à une isolation temporaire de l'animal jusqu'à disparition des symptômes de stress. Tous les animaux seront surveillés pendant la manipulation (-j0) et quotidiennement jusqu'à j+2. L'ensemble de ces mesures permettra de limiter grandement le stress des animaux et les risques potentiels associés à leur manipulation (=Raffinement).

**20119** Chez l'homme, la douleur neuropathique est très hétérogène : elle reflète des signes et des symptômes différents. Des douleurs peuvent survenir à la suite de lésion secondaire (diabète, effet secondaire de la chimiothérapie) ou traumatiques (sections d'un nerf). Ces douleurs se traduisent majoritairement par une allodynie (douleur induite par un stimulus normalement non douloureux) ou une hyperalgésie (sensation de douleur ressentie plus intensément) induite par le toucher, la pression, le froid et le chaud.

Sur le plan pharmacologique, la douleur neuropathique répond mal aux antalgiques classiques (Gapabentine, duloxetine et Morphine) d'où le besoin de mise au point de nouvelles molécules.

Le but de ce projet, est de fournir des résultats scientifiques, générés dans le respect systématique des normes éthiques les plus élevées, sur l'intérêt de molécules antalgiques destinées au traitement d'une allodynie thermique liée à une neuropathie traumatique.

Pour cela, nous souhaitons mettre en place un test d'immersion de la patte dans un modèle de neuropathie traumatique induite par la ligature du nerf sciatique.

Nos activités s'inscrivent dans le respect de la règle des « 3R » pour l'expérimentation animale. Si des méthodes alternatives existent lors des phases précoces de développement d'une molécule (modélisation informatique, ingénierie tissulaire, cellules souches), l'avancement de la caractérisation de la molécule d'intérêt ne permet pas à l'heure actuelle de remplacer l'étude de son efficacité chez l'animal vigile. Notre activité permet néanmoins de Raffiner les conditions d'utilisation des animaux en proposant de limiter le stress des animaux avec de l'habituation à la contention, et à la salle. L'objectif est de valider une température qui soit perçue comme non douloureuse pour un animal sain. Le temps de test est limité à maximum 15secondes.

Enfin, pour chaque étude, le nombre d'animaux utilisés est Réduit à un minimum acceptable pour l'obtention d'informations robustes et statistiquement pertinentes. Le nombre de rats utilisés pour cela est estimé à 306 rats répartis en 3 procédures. (estimation de 86 animaux la première année et de 110 par an sur les 2 années suivantes, ceci est modulable sur les années en fonction du temps pouvant être consacré à ce projet)

**20120** Le diabète constitue un problème de santé publique majeur puisqu'il est à l'origine de nombreux décès chaque année et son chiffre ne cesse d'augmenter. En effet, en 2019, le diabète affectait plus de 463 millions de personnes dans le monde, dont 59 millions en Europe, contre 108 millions en 1980 dans le monde. Les prévisions font états de 700 millions de diabétiques en 2045. Par ailleurs, selon l'OMS, une personne meurt des complications du diabète toutes les six secondes au niveau mondial. Le diabète est une maladie chronique qui survient lorsque le pancréas ne produit pas suffisamment d'insuline (hormone hypoglycémisante) ou lorsque les cellules ne sont pas capables d'utiliser efficacement l'insuline produite par l'organisme. Il y a alors un trouble de l'utilisation et du stockage du glucose apporté par les repas et une hyperglycémie apparaît. Cette dernière, conséquence courante d'un diabète non maîtrisé, peut au fil du temps provoquer de graves lésions cardiaques, vasculaires, oculaires, rénales et nerveuses. Dans le cas du diabète de type 2 (DT2), l'hyperglycémie provient d'une baisse de sensibilité à l'insuline des organes de stockage du glucose que sont le foie, le muscle et le tissu adipeux. 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, 80% du sucre ingéré est stocké dans le muscle sous l'action de l'insuline. 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. 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 des îlots pancréatiques et l'équilibre glycémique des animaux diabétiques transplantés. Par ailleurs, dans une autre étude *in vivo* réalisée récemment, nous avons montré qu'une injection quotidienne de notre Myokine X chez un modèle de rat développant un diabète de type 2, permettait de prévenir l'apparition de cette pathologie. 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 avoir un effet curatif du diabète sur un modèle de Rat DT2 ainsi que d'étudier les mécanismes impliqués. Au cours de ce projet, nous rechercherons également la posologie optimale de la Myokine X à utiliser pour traiter le DT2.

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 120 rats.

Raffinement :

Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement. Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, 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 préclinique des effets curatifs de notre Myokine X du DT2, 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 le modèle de rat ZSDS car il présente l'avantage de développer un diabète de type 2 similaire à l'Homme.

**20121** La règle des 3R (remplacer, réduire, raffiner) est un des piliers majeurs du bien-être animal et il est aujourd'hui encore impossible de se passer totalement du modèle in-vivo pour certains projets de recherche.

Quand cela est possible, l'utilisation d'animaux peut être remplacée, par des modèles *in vitro* (culture cellulaire, enzymologie ...), de modèle non régi par l'expérimentation animale (drosophile, *c elegans* ...) ou encore en ayant recours à de la modélisation informatique (*in silico*).

Le nombre d'animaux peut être réduit en ayant recours des outils statistiques pour planifier les études, en regroupant les projets entres eux ou encore en optimisant l'utilisation des échantillons biologiques prélevés.

Le raffinement est un concept peu plus difficile à appréhender, et consiste notamment en l'amélioration continue des techniques déployées.

Nos projets nécessitent d'avoir recours à des prélèvements répétés de sang chez les rongeurs vigiles. Ces prélèvements en plus d'être chronophages, peuvent induire un stress aigu notamment à cause de la contention de l'animal ce qui peut participer à la variabilité des résultats.

Dans ce contexte de raffinement, l'objectif de ce projet est donc de comparer deux techniques de prélèvement sanguin chez le rat et le hamster vigile. La première méthode est une des méthodes de référence pour obtenir un échantillonnage de sang via une contention de l'animal, la seconde est une méthode de prélèvement nécessitant une chirurgie pour la pose d'un cathéter, mais ne nécessitera plus de contention pour la réalisation des différents prélèvements.



Ce projet utilisera un maximum de 30 rats et 30 hamsters sur une durée de 1 an. Ce nombre est choisi de manière à obtenir les réponses attendues en ayant recours à des effectifs les plus petits possible.

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. L'ensemble de ces dispositions favorisent le principe de réduction, raffinement et remplacement (3R) de l'utilisation d'animaux à des fins scientifiques.

**20122** Le projet intitulé changements microvasculaires cérébraux induits par la milrinone chez le rat, est un projet de recherche fondamentale prévue sur une durée de 1an.

Une hémorragie sous-arachnoïdienne (HSA) correspond à la rupture d'un anévrysme développé telle une hernie aux dépens de la paroi d'une des artères qui vascularisent le cerveau. Le sang ainsi libéré se répand autour du cerveau. Les HSA font partie des accidents vasculaires cérébraux hémorragiques et leur incidence varie de 2 à 22.5/100 000 habitants en fonction des régions du monde. Après le traitement de l'anévrysme et de l'hémorragie, les patients victimes d'une HSA entrent dans une période de 3 semaines à risque de survenue de nouveaux épisodes d'ischémie cérébrale à l'origine de déficit neurologique (déficit cérébral ischémique retardé, DCI). Un DCI est observé chez 20 à 40% de patients et peut conduire à un handicap irréversible voire au décès. Un des mécanismes conduisant aux DCI est la survenue de spasme des artères cérébrales associé à la survenue de dépolarisations corticales envahissantes (SD) se propageant lentement sur le cortex depuis le caillot formé à la surface du cerveau lors du saignement initial. Lors de la survenue d'un spasme avec une diminution de la perfusion du cerveau, certains centres utilisent la Milrinone qui est un agent vasodilatateur artériel. Cependant le bénéfice sur la perfusion cérébrale et le devenir des patients est incertain, de même que les changements. L'objectif de ce projet consiste à mesurer les changements d'oxygénation et de perfusion du cerveau (artères, veines et capillaires) induits par une perfusion intraveineuse de Milrinone à l'état basal et lors du passage de SD, chez le rat. Ce projet utilisera un maximum de 12 animaux sur 1 an (10 animaux sont nécessaires à la réalisation du projet, et 2 animaux supplémentaires sont prévus en cas de problème expérimental). Nous utiliserons un animal par jour, pour une durée d'anesthésie de 4h30 à 5h sans réveil au cours d'une seule procédure expérimentale permettant de mesurer le métabolisme et la vascularisation cérébrale.

Conformité avec la règle des 3R : Remplacement : Les techniques de monitoring continues ne sont actuellement pas disponibles chez l'homme. C'est pourquoi un modèle animal a été choisi, ces phénomènes ne pouvant pas être modélisés ex vivo. Réduction : Chaque animal sera son propre contrôle ; une première SD sera déclenchée sans Milrinone puis une deuxième après perfusion de Milrinone. Raffinement : Chaque animal sera pesé et anesthésié puis une injection sous-cutanée d'analgésique et d'anesthésique local sera réalisée. L'homéostasie corporelle (températures, oxygénation, respiration, pression artérielle, hydratation...) sera monitorée en continu pendant toute la durée de l'expérimentation, et permettra d'adapter le niveau d'anesthésie et d'analgésie

Mots Clefs: Hémorragie sous-arachnoïdienne, vascularisation cérébrale, ischémie cérébrale, dépolarisation corticale envahissante.

**20123** L'hyperréflexie autonome (HRA) correspond à une hyperactivité sympathique en réponse à des stimuli sous-lésionnels chez les blessés médullaires ayant une lésion de la moelle épinière (LME) à ou au-dessus du niveau médullaire thoracique T6. Elle implique notamment une hypertension accompagnée d'une bradycardie. Dans les cas les plus sévères, l'épisode d'HRA peut être responsable de convulsions, d'hémorragie intra-cérébrale, d'arythmie cardiaque, et peut même parfois conduire au décès du patient. Cliniquement, ces épisodes surviennent généralement dans les 6 à 12 mois après la blessure et s'aggraverait avec le temps. Ils sont déclenchés par tout

stimulus fort, irritant ou douloureux sous le niveau de la blessure. Dans environ 80% des cas, ces stimulations sont d'origine urinaire (rétention d'urines, lithiase, infection de l'appareil urinaire).

En condition physiologique, la pression artérielle (PA) est étroitement régulée par le système nerveux autonome en assurant la constriction/dilatation des vaisseaux sanguins et en modifiant la fréquence cardiaque (FC). Ainsi, lors d'une stimulation forte, le système nerveux sympathique s'active et entraîne la constriction des vaisseaux sanguins du bas du corps. Cela résulte en une augmentation de la PA, détectée dans les artères par des détecteurs de pressions qui relayent ensuite ce message au cerveau. Ce dernier envoie ensuite des signaux par la moelle épinière et les nerfs crâniens pour relâcher les vaisseaux sanguins et ralentir la FC. Cela restaure une PA normale. Cependant, suite à une LME, le signal pour relâcher les vaisseaux sanguins est interrompu et ne peut pas atteindre le bas du corps. Ainsi, ces derniers demeurent contractés, la PA normale ne peut pas être rétablie et reste anormalement élevée. Si elle n'est pas traitée rapidement, cette situation peut mener à un accident vasculaire cérébral, une crise cardiaque, voire la mort.

Le traitement consiste en premier lieu à traiter le facteur déclenchant le plus courant, la distension vésicale, pour réduire la PA (vidange vésicale par exemple). En cas de persistance de la poussée hypertensive, il est indiqué d'avoir recours aux traitements médicamenteux antihypertensifs (inhibiteurs calciques ou dérivés nitrés).

Une meilleure connaissance de ce dysfonctionnement neurovégétatif est indispensable à la prévention des épisodes d'HRA et à son traitement, afin d'en éviter les complications sévères. Par ailleurs, il est nécessaire de réaliser des tests précliniques, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants.

Malheureusement, il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de ce dysfonctionnement (remplacement). Ainsi, dans ce contexte, les modèles précliniques les plus pertinents présentant des caractéristiques similaires à celles observées chez l'homme sont les rats ayant subi une transection de la moelle épinière (SCI) au-dessus de T6. Ces modèles ont, par ailleurs, été précédemment employés pour évaluer l'effet de médicaments pour le traitement de l'HRA.

Les études pharmacologiques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation d'environ 750 rats sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (15 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance de l'animal. De plus, ces animaux qui présentent un trouble mictionnel lié à la spinalisation, nécessiteront un change adapté. Ainsi, il est prévu une augmentation de la fréquence et de la quantité de litière (raffinement).

**20124** Le glioblastome multiforme (GBM) est la tumeur du système nerveux central la plus fréquente et la plus agressive avec une incidence de 5 cas pour 100000 habitants et une survie moyenne de 12 à 15 mois. Les traitements actuels sont essentiellement palliatifs et consistent en une exérèse chirurgicale associée à la radio et/ou à la chimiothérapie, mais ces traitements sont peu efficaces et toxiques pour les cellules saines. De plus, ce sont des tumeurs diffuses et infiltrantes, ce qui dans certains cas ne permet pas d'exérèse chirurgicale optimale. Lorsque l'exérèse est possible, un patch anticancéreux est déposé dans la cavité tumorale pour délivrer un anticancéreux, la carmustine, un agent alkylant sans ciblage spécifique. Ce traitement est régulièrement suivi de récurrences dues aux cellules souches restantes qui sont résistantes aux traitements actuels, ce qui aboutit au décès des patients au bout de quelques mois.

La séquence d'un peptide de 24 acides aminés nommé NFL-TBS.40-63 (Neuro Filament Low subunit-Tubulin Binding Site 40-63), ou peptide NFL a été identifié. Ce peptide est issu des filaments intermédiaires et est capable de lier la tubuline. Il interagit spécifiquement avec différentes lignées cellulaires de GBM en inhibant leur croissance cellulaire *in vitro* et leur développement tumoral *in vivo*, sans toucher aux cellules saines. Il entre aussi dans les cellules souches de GBM issues de

patients en détruisant leur réseau de microtubules et en provoquant leur mort par apoptose. Enfin, ce peptide peut s'adsorber sur des nanocapsules lipidiques et permettre le ciblage des cellules.

Ces résultats montrent que ce peptide représente un candidat intéressant et prometteur pour cibler les cellules cancéreuses et les cellules souches cancéreuses de GBM. Il apporte également une opportunité dans le développement de nouveaux traitements anti-GBM.

Ce travail s'intéresse à tester des nanorobots, composés du peptide NFL couplé à des nanobâtônnets de silicium poreux recouverts d'oxyde de fer. Les travaux sur des cellules de GBM en culture ont montré l'efficacité de ces nanorobots et leur peu de toxicité sur les cellules saines.

Ce nouveau système regroupe différents aspects intéressants dans le traitement du GBM :

- l'utilisation d'un matériau biocompatible et biodégradable, intéressant pour les applications biomédicales
- des particules magnétiques utiles pour réaliser du guidage magnétique et/ou de l'hyperthermie pour atteindre la tumeur
- et le peptide NFL ciblant les cellules du GBM.

Les travaux *in vivo* sur animaux seront divisés en 3 études, et à chacune de ces études et des résultats obtenus, le nombre d'animaux sera randomisé et réduit si nécessaire.

Le but de la première étude sera d'évaluer la non-toxicité ou le peu de toxicité de ces nanorobots sur des rats sains (61 groupes de 6 rats sains). En fonction des résultats, l'efficacité du guidage magnétique/accumulation des nanorobots et de l'efficacité thérapeutique des nanorobots selon la lésion de la barrière hémato-encéphalique sur des rats porteurs de GBM seront étudiées (37 groupes de 6 rats porteurs de GBM). Enfin, l'efficacité thérapeutique des nanorobots couplés à un agent médicamenteux sur des rats porteurs de GBM sera analysée (14 groupes de 6 rats porteurs de GBM) (cf. Annexes 1 et 2).

Le nombre total d'animaux nécessaires maximum à cette étude préclinique sera de 739 rats (112 groupes de 6 rats + 10 % en cas de perte d'animaux liée à une chirurgie par stéréotaxie ou aux traitements).

Selon des résultats des expériences précédentes réalisées, ce nombre maximal est nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement suffisants, en tenant compte des risques inhérents au protocole. Dans cette saisine, il y a différentes études, et selon la progression des études il y aura une poursuite ou non et ainsi un raffinement des protocoles et gestes opératoires sur animaux pour réduire le nombre d'animaux au strict minimum.

Ces travaux respectent au mieux la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE, en remplaçant ou en réduisant le nombre d'animaux utilisés au strict minimum. Les tests statistiques ont déjà été définis pour réduire au strict minimum le nombre d'animaux utilisés tout en obtenant des résultats exploitables. Les conditions d'hébergement des animaux sont également adaptées avec un environnement contrôlé en température, des cycles jour/nuit 12h/12h et des milieux enrichis.

**20125** Actuellement, la prise en charge thérapeutique des maladies auto-immunes se fait à trois niveaux : contrôler les symptômes, contrôler l'auto-immunité et neutraliser ou éliminer les auto-anticorps.

Nous proposons dans ce projet d'évaluer une alternative thérapeutique en utilisant une petite molécule chimique pour cibler les voies de synthèse des nucléotides essentielles au développement et à la prolifération leucocytaire. Dans ce but, nous avons développé des composés efficaces *in vitro*, sélectifs et non toxiques chez l'animal. Ces molécules sont issues d'un repositionnement et d'un long processus d'optimisation et de sélection par notre laboratoire de composés existants déjà en essai clinique de phase III ou sur le marché.

Dans cette demande, nous proposons donc de réaliser des expériences chez la souris afin de déterminer si nos candidats thérapeutiques réduisent *in vivo* l'activation et/ou le recrutement des cellules de l'immunité innée (neutrophiles et macrophages) dans un modèle de péritonite aiguë induite. En parallèle mais indépendamment à cette demande, l'impact sur la composante lymphoïde

sera également caractérisé à partir d'organes lymphoïdes (rate, ganglions, thymus) et stimulations ex-vivo. Toutes ces manipulations et techniques d'évaluations sont largement optimisées et maîtrisées au sein du laboratoire.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R :

- REMPLACEMENT : notre projet se fera dans la continuité d'études *in vitro*. Le passage au modèle *in vivo* est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique chez les patients. Nous avons besoin d'un modèle permettant de reproduire d'un point de vue phénoménologique tout ce qu'implique le développement d'une réponse immunitaire complète. Un organe isolé ou une espèce, autre que les mammifères, ne permettra pas d'évaluer la biodistribution du candidat thérapeutique évalué. Nous choisirons des modèles chez la souris, simples et exhaustivement décrits dans la littérature.

- REDUCTION : le bénéfice potentiel de notre stratégie sur la composante lymphocytaire sera exploré ex-vivo, à partir d'organes n'impliquant aucun geste expérimental sur les animaux et en tentant d'obtenir le maximum de données à partir du même matériel cellulaire : analyse de l'impact de nos molécules sur lymphocytes T et B, la prolifération et l'activation, les productions de cytokines, d'anticorps...). Concernant cette demande, le nombre d'animaux a été limité au minimum nécessaire pour permettre de fournir des résultats statistiquement significatifs.

- RAFFINEMENT : 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). L'apparition de signes d'inconfort ou d'éventuelle souffrance nous conduira à choisir l'action appropriée (comme par exemple l'apport d'un analgésique) à mener en fonction d'une grille de score du bien-être.

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 5 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 toute altération du bien-être animal.

De plus, au préalable à ces expérimentations, nous avons pris la précaution de faire réaliser par un prestataire externe des études toxicologiques chez la souris afin de valider l'innocuité de nos composés aux doses envisagées.

Pour ce projet, qui s'inscrit dans la recherche de nouvelles formes thérapeutiques dans le traitement des maladies auto-immunes, nous avons estimé devoir impliquer un nombre maximal d'animaux de 240 souris.

**20126** 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. La fonction de nombreuses cellules immunitaires, notamment les cellules phagocytaires mononucléées (monocytes, macrophages et cellules dendritiques), est altérée. Les macrophages alvéolaires ont une capacité de phagocytose diminuée plusieurs mois après une première infection. Cette immunodépression post-septique, initiée par l'activation du récepteur SIRP $\alpha$ , 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.

Ce projet vise donc à explorer les cellules phagocytaires mononucléées en caractérisant les mécanismes de phagocytose et de production de cytokines et en évaluant l'efficacité de nouveaux composés inhibiteurs du système SIRP $\alpha$ /SHP2 pour restaurer cette fonction.

En proposant de traiter l'hôte et non le pathogène, de nouvelles stratégies thérapeutiques d'immunorestauration ou d'immunostimulation se développent actuellement et s'inscrivent dans la lutte contre l'antibiorésistance.

Pour cela, le projet nécessitera 720 souris C57Bl/6 pour une étude pilote de toxicité des molécules. Elle pourrait nécessiter ensuite jusqu'à 4212 souris pour l'exploration fonctionnelle et l'évaluation des molécules.

Remplacement : Les paramètres immunitaires étudiés dans ce travail ne peuvent être aujourd'hui remplacés par des procédures *in vitro*

Réduction : Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au minimum le nombre d'animaux en choisissant d'évaluer uniquement les nouvelles molécules ayant fait leur preuve *in vitro* (3 lignées cellulaires) et ayant montré une faible toxicité sur une lignée cellulaire murine.

Le nombre a aussi 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 (groupes 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 pendant toute l'étude avec évaluation des signes généraux quotidienne. Une grille d'appréciation a été mise en place avec un système de barème de points afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, le stress ou l'angoisse des souris et d'obtenir des informations pertinentes à moindre coût dans le cadre du bien-être animal. (Annexe 1)

**20127** 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 des animaux placés en condition de stress chronique. 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 60 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 :

- « 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...).

- « 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. Afin d'éviter de commander des animaux pour notre test préliminaire, nous utiliserons les animaux de notre installation expérimentale.

- « 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. Pour améliorer les observations des tests de comportement, nous utiliserons des tunnels afin de déplacer les animaux sans les prendre par la queue.

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, vocalise, mobilité, alimentation...) Le report hebdomadaire 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 24 heures.

**20128** En aquaculture, les pathologies infectieuses constituent une menace importante, d'autant que les traitements ou vaccins existants présentent souvent une efficacité limitée.

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 (techniques de caractérisation des variations génétiques du génome permettant la réalisation d'assignation de parenté), couplé aux résultats de mortalité et de survie, permettra 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.

Ce projet a pour objectif de vérifier l'efficacité de la stratégie de sélection génétique sur le caractère de résistance à un pathogène. Il consistera à comparer les résistances et les héritabilités de deux lots de poissons ayant des niveaux de sélection différents dans un contexte d'épreuves infectieuses expérimentales. Les maladies Nodaviruse et Vibriose sont responsables de fortes mortalités dans les élevages pouvant aller jusqu'à 100% pour la nodaviruse chez les jeunes alevins. Ces modèles expérimentaux sélectionnés sont maîtrisés et chacun sera testé à la fois sur un lot de bars sélectionnés et sur un lot de bars non sélectionnés. La réalisation de ces procédures représente un total de 9300 poissons. Les retombées attendues sont une amélioration de la santé et du bien-être des poissons en élevage ainsi qu'une diminution de l'utilisation des médicaments.

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.

**20129** La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie auto-immune, articulaire, inflammatoire et chronique qui touche de multiples articulations. Elle se manifeste par des poussées de durée variable et des périodes d'accalmie. Sans traitement, la maladie atteint progressivement de nouvelles articulations et entraîne la déformation ou la destruction progressive des articulations touchées (souvent celles des mains et des pieds). Ces dommages sont irréparables. On ne peut guérir une polyarthrite rhumatoïde, mais les traitements lourds existants soignent les poussées et préviennent leur apparition.

Notre équipe a mis au point une thérapie cellulaire basée sur des cellules suppressives dérivées d'un type de globules blancs humains, les monocytes qui ont été appelées HuMoSC correspondant

à l'acronyme anglais de cellules suppressives d'origine myéloïde. Mais le nombre de HuMoSC générées n'est pas très important et la présence des billes magnétiques couplées à des anticorps utilisées pour le tri de ces cellules empêchent le passage en grade clinique. Cela nous a encouragé à étudier l'effet du surnageant de culture des HuMoSC et de cellules isolées avec un protocole proche, les CD14-HuMoSC. Nos résultats montrent que ces surnageants de culture ont les mêmes propriétés que les HuMoSC *in vitro*. En effet ces surnageants inhibent la prolifération et l'activation des globules blancs impliqués dans l'inflammation. Il nous faut donc maintenant étudier ces propriétés *in vivo*.

L'objectif de ce travail de recherche est donc de confirmer l'effet immunosuppresseur du surnageant, sur l'inflammation articulaire dans des modèles murins dans lesquels le rhumatisme inflammatoire est induite par l'injection de collagène, en vue d'une utilisation en thérapeutique pour les rhumatismes inflammatoires, type polyarthrite rhumatoïde.

Remplacement : La complexité des réactions immunitaires au cours de la polyarthrite rhumatoïde ne pouvant pas être modélisée *in vitro*, nous n'avons pas de moyen de remplacement du modèle animal et devons donc effectuer nos études sur des animaux vivants.

Réduction : Pour réaliser ce travail de recherche, 12 souris DBA/1 seront nécessaires. Le nombre de souris indispensables à la réalisation de ce projet a tenu compte des exigences, de réduction en diminuant le plus possible la taille des groupes tout en permettant d'obtenir des résultats scientifiques validés.

Raffinement : Le suivi de l'évolution de la maladie chez les souris sera effectué 3 fois par semaine et le personnel technique de l'animalerie se chargera de l'entretien quotidien des cages dans le respect des bonnes pratiques liées à l'expérimentation animale. De plus, le bien-être des souris et la réduction de leur souffrance sera notre priorité et les souris seront mises à mort dès que la polyarthrite sera trop sévère (une grille de surveillance de l'inflammation des articulations et de la souffrance des animaux a été établie).

**20130** La dépression touche environ 350 millions de personnes dans le monde dont la moitié n'a pas accès à un traitement efficace (source rapport OMS 2012). La résistance aux antidépresseurs est de plus en plus décrite et par conséquent, il est important de trouver une alternative plus efficace pour les patients pharmaco-résistants. Ces dernières années, des progrès considérables ont été accomplis en stimulant électriquement (grâce à la stimulation cérébrale profonde) ou superficiellement (par la stimulation magnétique trans-crânienne répétée) des zones du cerveau qui présentent une activité déficitaire chez les personnes déprimées (comme le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens ou l'habenula latérale), induisant une rémission totale et durable chez des patients ne répondant à aucune pharmacothérapie. Cependant, la stimulation cérébrale profonde est une méthode très invasive à laquelle peu de patients acceptent d'avoir recours, et la discrimination spatiale de la stimulation magnétique transcrânienne est médiocre, ce qui en limite aussi l'utilisation. Récemment, il a été montré que la stimulation ultrasonore peut modifier l'activité électrique cérébrale, en étant très précise et non invasive. Cependant, cette méthode n'a pas encore été utilisée pour induire une réversion des états dépressifs.

L'objectif de cette étude sera donc de démontrer la faisabilité de la stimulation cérébrale par onde ultrasonore de plusieurs régions précises du cerveau (par exemple le cortex cingulaire antérieur, le noyau accumbens ou l'habenula latérale) dans un modèle animal de dépression et si cette stimulation permet de reverser de façon durable les symptômes de la dépression.

Ce projet vise à développer une alternative thérapeutique aux patients pharmaco-résistants. Pour cette expérience, 602 rats seront nécessaires.

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : les conditions d'élevage des animaux seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu. Les expérimentateurs sont experts dans la préhension/contention des animaux et sont soucieux d'éviter tout stress lors de la réalisation des procédures. Les injections quotidiennes d'antidépresseur ont été remplacées par un traitement par

voie orale dans l'eau de boisson. Avant et après l'intervention, les animaux recevront un traitement analgésique, un anti-inflammatoire et puis si nécessaire un traitement antibiotique. Chaque animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter toute hypothermie. Les cornées sont protégées de la déshydratation par l'application d'un gel oculaire. 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 animal et intervenir si nécessaire. Les points limites pour lesquels l'expérimentation sera arrêtée sont soit une immobilité soit une prostration de l'animal, soit une perte de poids supérieure à 15%, soit une chute de température (diminution de 2°C et < 35°C). Ces paramètres seront évalués quotidiennement.

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Le modèle génétique chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible. De plus, les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais qui ne peuvent être réalisés que sur animaux sacrifiés avec délai post-mortem et conditions de prélèvement contrôlés.

Réduction : les effectifs sont optimisés, sur la base de nos études antérieures, les observations comportementales nécessitent une taille d'effectifs suffisant compte tenu de la variabilité inter-individuelle (n=16 sujets par groupe). De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

**20131** Le projet : Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome.

Nous voulons développer et mettre au point une technique de production d'organoïdes à partir de tumeur primaire. Nous possédons une collection de xénogreffe dérivée de la tumeur de patient (nommé PDX) obtenue grâce à des fragments tumoraux provenant de patients et qui ont été greffés chez des souris immunodéprimées dans le cadre de projets antérieurs de l'équipe. Ces tumeurs après croissance tumorale ont été prélevées et congelées dans des conditions adaptées. Afin de pouvoir travailler sur des tissus frais il faut revivifier ces tissus congelés en passant à nouveau par une xénogreffe dans une souris immunodéficente.

Notre objectif est de pouvoir, grâce à ces tissus frais, mettre au point une technique de culture de tumeur primaire provenant de tissu frais de patient pour l'obtention d'organoïdes tumoraux et ainsi limiter le recours au modèle animal. Cette étape est nécessaire afin de valider notre protocole en routine.

Le projet consiste à xénogreffer des fragments de tumeurs congelées chez la souris immunodéficente. Une fois que la tumeur se sera développée, la souris sera euthanasiée par une méthode réglementaire afin de permettre le prélèvement de tissu frais tumoral.

Les animaux :

\* Type : Souris immunodéficientes de type NMRI-Nude commerciale.

\* Nombre: Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 216 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 tumoral 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 cohérents et fiables dans le but d'obtenir une librairie de PDX conséquentes afin d'analyser au mieux le matériel tumoral. A cause de la variabilité de la prise de greffe, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait une banque trop faible en nombre de PDX. L'objectif du projet constitue lui-même un élément de réduction. En effet, nous souhaitons produire des organoïdes qui permettraient à terme de réduire l'utilisation du nombre d'animaux vivants pour certaines parties des projets de recherche de l'équipe qui utilise actuellement des animaux à des fins scientifiques. Ce projet s'inscrit donc pleinement dans un objectif de réduction à long terme.

\*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.).

**20132** Les mécanismes de toxicité radiologique sur cellules saines et tumorales dans le contexte de la Radiothérapie Interne Vectorisée (RIV) restent à ce jour peu connus. La RIV repose sur l'administration, principalement par voie systémique, d'un radio-pharmaceutique composé d'une molécule vectrice et d'un radioisotope. Le radiopharmaceutique va se fixer préférentiellement sur les cellules cibles. Contrairement à la radiothérapie externe (RTE) est la forme la plus courante de radiothérapie : les rayons ionisants sont émis sous la forme de faisceaux par un accélérateur linéaire de particules situé à distance du patient. L'implémentation de ces paramètres lors de la planification des traitements permettrait d'optimiser les traitements personnalisés en RIV. Les contraintes de doses admissibles en RIV sont mal connues, mais sont en théorie transposables de celles rapportées en radiothérapie externe (RTE) grâce au calcul de la dose efficace biologique (BED). Dans le cadre de la stratégie de RIV du mélanome métastatique par ciblage de la mélanine, que nous développons, l'organe à risque est la rétine, du fait de sa pigmentation. L'objet de ce projet est d'étudier l'impact du débit de dose en radiothérapie externe sur un organe à risque, la rétine, afin de déterminer les paramètres radiobiologiques permettant de calculer la BED, sur un modèle murin. Ces paramètres radiobiologiques seront par la suite utilisés pour déterminer les activités injectées en RIV censées générer les mêmes toxicités que celles mesurées avec la RTE, de manière à pouvoir déterminer la limite acceptable au regard des risques radiobiologiques répertoriés pour cet organe.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Remplacement : À la suite des études *in vitro*, l'évaluation des altérations rétiennes lors de traitements par irradiations 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 reconnu par la littérature pour reproduire les caractéristiques de la physiologie humaine. La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

Réduction : Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum 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 870 souris maximum sur une période de 5 ans.

La surveillance quotidienne des animaux permettra de déceler les premiers signaux de stress, de douleurs ou d'inconfort pour l'animal qui pourront être améliorés par l'administration d'antalgiques avant l'atteinte des points limites définis. Les conditions d'hébergement seront optimisées (portoirs

ventilés, température, hygrométrie, luminosité, densité animale, enrichissement de milieu avec coton pour la nidification, bâtonnet de bois pour ronger et cabane de cachette).

Pour finir, ce projet devrait permettre de valider l'utilisation du calcul de la BED afin d'intégrer systématiquement la BED lors des calculs des contraintes de doses en RIV chez l'homme.

**20133** Ce protocole s'inscrit dans une stratégie de ciblage d'un antigène surexprimé dans un certain nombre de tumeurs solides, identifié comme inhibant l'activation de la mort cellulaire. L'objectif de ce projet est de développer et de valider un radiopharmaceutique qui permettrait, par l'imagerie en médecine nucléaire, de quantifier *in vivo* l'expression de cette protéine au niveau des tissus tumoraux.

L'objet de ce projet sera de sélectionner sur 3 candidats (1 anticorps et 2 fragments Fab) radiomarqués à l'indium-111 (isotope traditionnellement utilisé en médecine nucléaire pour le radiomarquage d'anticorps), celui dont la distribution *in vivo* sera la plus favorable à l'obtention d'une imagerie tumorale hautement contrastée et spécifique.

Ce projet consistera donc, chez des souris porteuses de xénogreffes tumorales (5 modèles de tumeurs solides), en une étude de distribution *in vivo* par imagerie SPECT et prélèvements ex vivo d'organes, après administration de 3 composés radiomarqués à l'indium-111.

La règle des 3R sera scrupuleusement respectée.

Remplacement : la validation préclinique du ciblage *in vivo* de l'antigène tumoral 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 la xénogreffe chez la souris. 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. En cas d'apparition de points limites définis, le protocole sera stoppé et l'animal mis à mort selon la réglementation en vigueur. 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).

Réduire : Le nombre d'animaux par groupe (3 pour le suivi par imagerie et 5 pour les prélèvements) a été réduit au maximum tout en permettant l'exploitation des résultats. Ainsi pour les études d'imagerie à différents temps post injection, ce sera les mêmes animaux qui seront examinés.

Le nombre total d'animaux utilisé sera de 420 pour ce projet.

**20134** Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de l'enfant et de l'adolescent sont des cancers pédiatriques rares, dont le pronostic s'est peu amélioré au cours des 25 dernières années. Les taux de rechute et de survie sont respectivement d'environ 45% et 65%. Le traitement standard comprend une polychimiothérapie, parfois associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour les patients de haut risque ou en rechute. La greffe de CSH est un traitement lourd, source de séquelles à long terme. Des progrès sont donc nécessaires pour réduire le taux de rechute, améliorer la survie et limiter les séquelles. L'objectif de nos études est de caractériser les mécanismes mis en jeu dans les leucémies (cancer des cellules sanguines) de l'enfant à mauvais pronostic. Pour cela nous identifions les gènes altérés par des mutations (oncogènes ou gènes suppresseur de tumeurs) dans les échantillons de patients atteints de leucémie puis nous exprimons ces mutations dans des cellules normales pour comprendre le rôle de ces mutations dans la transformation cancéreuse et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour ce projet, nous réalisons des approches de cultures cellulaires *in vitro* et des approches de modélisation bioinformatique pour comprendre les conséquences de ces mutations. Les modèles murins sont incontournables car nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier l'apparition et la progression des leucémies pédiatriques. En effet, 1) La génération et la maturation terminale de

toutes les lignées hématopoïétiques à partir de cellules souches n'est actuellement pas possible par des techniques de culture *in vitro*, 2) Des lignées cellulaires immortalisées et poussant *in vitro* ne sont pas disponibles pour la plupart des oncogènes que nous étudions. D'autre part, plusieurs études montrent que ces lignées cellulaires cultivées *in vitro* divergent significativement des échantillons leucémiques de patients, 3) Les approches de culture *in vitro* ne permettent pas reproduire certaines caractéristiques des leucémies (ex : infiltration des cellules leucémiques dans le système nerveux). Comme certaines leucémies sont spécifiques de l'enfant, il est important de comprendre la spécificité des différents stades de développement sur l'apparition et le type des tumeurs *in vivo*, 4) Des modèles précliniques *in vivo* sont indispensables pour développer des composés pharmacologiques efficaces pour cette pathologie de très mauvais pronostic. Dans ce projet, nous injecterons des cellules de foie fœtal à différents stades de développement embryonnaire qui expriment les mutations dans le foie fœtal d'embryons receveurs. Nous travaillerons dans le respect de la règle des 3R. Réduire : Pour ce projet, nous utiliserons 630 animaux sur 3 ans, nombre minimal requis pour avoir des groupes significatifs, permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans avoir recours à une répétition des protocoles. Remplacer : le remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes est impossible ; en effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité physiologique des interactions cellulaires au sein d'un organe. Raffiner : les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Tout animal qui présentera un des points limites d'arrêt de la procédure définis pour limiter la douleur ou la souffrance (traitements antalgiques pré- et post-opératoires, imagerie non invasive sous anesthésie) sera euthanasié. Une surveillance continue des animaux sera effectuée afin de détecter tout éventuel signe de leucémie et des mesures pour les soulager seront prises comme des soins spécifiques et des adaptations alimentaires.

La totalité des animaux sera mise à mort à la fin des procédures selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever tous les échantillons tissulaires permettant une exploitation optimale des données tissulaires et cellulaires.

**20135** La majorité des maladies infectieuses émergentes dans le monde sont dues à des virus responsables d'infections invalidantes ou même mortelles chez l'homme. Ainsi, le Coronavirus SARS-Cov 2 (Covid-19) est actuellement responsable d'une pandémie qui touche des centaines de millions d'individus et qui a déjà entraîné plus de 5 millions de décès. La seule réponse universelle, efficace et de faible coût est la vaccination. Actuellement, les vaccins les plus efficaces sont à base d'ARN qui codent pour l'antigène majeur, Spike, du Coronavirus. Cette technologie innovante, très proche de celle à ADN que nous préconisons, s'est révélée très supérieure à toutes les technologies classiques à base de virus ou même supérieure aux technologies utilisant des protéines pures. Les vaccins à ARN se sont révélés efficaces, mais leur première génération commence à se heurter à la réalité des virus à génome ARN qui mutent constamment. Les différentes pressions de sélection, induisent la sélection de nouveaux variants généralement plus aptes à se multiplier, à survivre et à contourner les protections immunitaires. L'apparition de ce phénomène était appréhendée par les virologues et les immunologistes, c'est lui qui est à l'origine des vagues pandémiques successives des variants viraux. Le variant viral Delta, qui présente un degré de transmissibilité très élevé, a effectivement pris le dessus actuellement. Cependant, il est probable qu'il sera remplacé par d'autres virus plus infectieux ou moins contrôlés par les réponses immunes développées après infection ou vaccination. Nos travaux visent à obtenir un vaccin anti-SARS-CoV-2 à large spectre protégeant contre tous les variants actuels et à venir. Nos résultats antérieurs montrent qu'un vaccin ADN/Vésicules, déclenche un bon niveau de réponses immunes contre une région antigénique du SARS-CoV-2 qui est commune chez tous les variants. Pour des raisons d'efficacité et d'acceptabilité sociale nous avons basculé notre vaccin ADN/vésicules sur un vaccin ARN/Vésicules. Nous projetons de comparer ici l'efficacité des 3 types d'administrations : ADN/vésicules, ARN/vésicules et vésicules en utilisant des voies d'administration adaptées à chaque immunogène. En ce qui concerne le "Remplacement" de la règle des 3R, nous pouvons affirmer que le remplacement des modèles animaux n'est pas possible ici et que l'étude des

réponses immunitaires et des protections naturelles nécessitent l'utilisation de modèles animaux. La vaccination expérimentale chez la souris commune *Mus musculus*, s'impose comme un modèle expérimental pour tester l'immunogénicité et la protection donnée par des candidats vaccins contre ces virus. L'immunogénicité des candidats vaccins sera testée chez la souris adulte BALB/c qui est une souris immunocompétente. Conformément à la règle des 3R, nous procédons à une "Réduction" au maximum le nombre d'animaux utilisés, avec des essais d'immunogénicité impliquant un effectif total de 90 souris. Nous prévoyons de tester 4 protocoles différents (plus un contrôle négatif) combinant différentes préparations antigéniques et un schéma d'immunisation qui a montré son efficacité lors d'immunisations antérieures ainsi qu'une méthode de vaccination intranasale peu invasive qui donne des résultats inédits pour d'autres virus. Ces animaux sont répartis afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ; ainsi, nous utilisons des groupes de six (6) individus pour chaque condition de l'étude ; c'est un nombre de souris relativement réduit, mais la bibliographie et toutes nos études antérieures ont montré qu'il permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs avec nos immunogènes à base de vésicules. Pour nous conformer au "Raffinement" de la méthode préconisée par la règle des 3R, nous avons mis en place des points limites pour d'éventuels signes d'inconfort, de stress ou de douleur (suivi quotidien des animaux et suivi hebdomadaire du poids - arrêt des expérimentations et euthanasie de l'animal s'il y a une perte de poids de plus de 15 %) ; cela permet de garantir au mieux le bien-être des animaux. Pour garantir le statut sanitaire des animaux, ceux-ci seront manipulés et changés uniquement sous hotte stérile (poste de sécurité biologique). Pour prendre en compte la sensibilité des animaux albinos à la luminosité, nous travaillerons sans la lumière de la hotte. Pour éviter le stress lors des administrations, seul l'animal concerné sera posé sur une cage à part, les autres congénères resteront dans leur cage avec couvercle ce qui les isole du bruit et des odeurs.

**20136** L'objectif du projet est de permettre aux étudiants en chirurgie d'être confrontés à toutes les difficultés liées à la chirurgie afin de les préparer à leur future fonction. Il s'agit également de répondre à la demande de la Haute Autorité de Santé qui exige qu'aucun acte ne soit réalisé directement sur le patient et à la réforme de l'internat qui prévoit des formations hors du service hospitalier.

Ces enseignements pratiques seront réalisés en binôme et en autonomie (un animal pour deux) encadrés en continu par des formateurs compétents.

Les formateurs pourront guider voire aider un binôme en cas de difficulté. Les participants devront pratiquer les techniques chirurgicales selon les mêmes principes et la même rigueur qu'une intervention chez l'humain.

Cette formation répond aux critères des 3R tel que :

- Réduction : Chaque animal est utilisé pour plusieurs étudiants. La dualité du système urinaire permet par exemple à chaque étudiant de réaliser une néphrectomie d'un côté.

- Remplacer : Il ne sera réalisé que des gestes techniques et des mises en situation d'urgence qui ne sont pas réalisable sur simulateur et que l'on ne peut apprendre de façon théorique dans les livres. De plus, dans le cadre de la réforme et afin de réduire le nombre d'animaux, les étudiants internes auront d'abord été formés au cours de leur première année d'internat à la pratique chirurgicale et à la simulation sur pelvitainer (gestion des pinces de coelioscopie sur modèle 3D), simulateur électronique de coelioscopie et sutures sur pièces anatomiques de porc.

- Raffinement : La procédure est réalisée sur modèle porcin comme elle le serait sur l'être humain, soit sous anesthésie générale avec une prémédication afin de ne pas faire souffrir d'animal. La fin de l'intervention consiste en une mise à mort sans réveil afin de ne pas induire une souffrance aux animaux qui ont été opérés et qui n'ont plus de système urinaire.

La formation de 2 niveaux sera organisée selon l'ancienneté de l'interne :

Niveau I : Un programme de 4 séances est prévu pour les internes de milieu d'internat.

Les quatre procédures encadrées sont :

- la néphrectomie par laparotomie : Exérèse des reins après avoir repéré et disséqué les structures d'intérêt (artère rénale, veine rénale, uretère).

- la greffe rénale et chirurgie vasculaire par laparotomie : Exérèse du rein et greffe de celui-ci sur les vaisseaux iliaques. Les anastomoses artérielle et veineuse doivent être perméables et étanches.

- la cystectomie et entérocystoplastie par voie ouverte : Exérèse de la vessie et remplacement de celle-ci par une plastie d'intestin. Suture entre l'urètre et la plastie. Remise en continuité de l'intestin restant.

- la découverte de la pratique de la coelioscopie avec réalisation d'une néphrectomie coelioscopique. Mise en place des trocarts de coelioscopie, repérage et dissection des structures d'intérêt (artère rénale, veine rénale, uretère) puis exérèse du rein.

Niveau II : Un deuxième programme de 4 séances également est prévu pour les internes en fin de formation (9ème semestre minimum d'internat). Les étudiants regroupés en binôme réaliseront des techniques de coeliochirurgie, soit vidéo assistée.

Les quatre procédures encadrées sont :

- la prostatectomie coelioscopique : Décollement de la vessie pour accéder à la prostate. Ouverture du col vésical, Dissection et exérèse des vésicules séminales, dissection des faces latérales, antérieures et postérieures pour exérèse de la prostate. Suture urétrovésicale pour remise en continuité.

- la néphrectomie coelioscopique : Idem 1er cycle avec ajout des situations d'urgence : plaie de la veine rénale, plaie de la veine cave inférieure à droite, plaie de l'aorte à gauche.

- la cure de jonction urétéropyélique coelioscopique : dissection de l'uretère, section et résection de jonction pyélourétérale, suture urétéropyélique pour remise en continuité.

- la promontofixation coelioscopique : Mise en évidence du promontoire, Incision péritonéale, Dissection de la paroi antérieure du vagin, mise en place d'une prothèse entre le vagin, l'isthme utérin et le promontoire.

L'utilisation du modèle porcin se justifie par les similitudes anatomiques pelviennes et abdominales (chirurgie rénale, prostatique, statique pelvienne, curages lymphatiques). La chirurgie sur animal vivant sous anesthésie générale permet de recréer toutes les contraintes d'installation et les risques per-opératoires (notamment hémorragique, splénique, digestif, rectal).

Pour un bon apprentissage des techniques tout en limitant le nombre d'animaux il nous est apparu essentiel de ne pas avoir plus de deux étudiants par animal, soit 44 étudiants/an (22 binômes).

Au total, le nombre d'animaux estimé est de 88 porcs par an soit sur 5 ans 440 porcs.

En somme, ce programme en deux niveaux entre dans la formation obligatoire indispensable des jeunes chirurgiens en recréant les risques per opératoires réels auxquels ils seront confrontés par la suite dans leur métier.

**20137** Les maladies neurodégénératives sont causées par la mort de neurones suites à des stress et à des dérégulations cellulaires.

Les causes de ces maladies sont diverses, mais s'accompagnent toutes de profonds changements dans l'expression de gènes et de la synthèse de protéines. Ces changements ont un effet direct sur le processus de mort neuronale.

Ce projet a pour objectif de collecter des tissus biologiques (de différentes régions cérébrales) de souris traitées avec des candidats médicaments pour les maladies neurodégénératives.

Les candidats médicaments sont conçus pour moduler l'expression de gènes impliqués dans les maladies neurodégénératives.

Le traitement ne sera administré qu'une seule fois (administration unique), par injection intracérébroventriculaire. Les prélèvements de tissus biologiques seront réalisés 1 semaine après administration.

À cette fin, le nombre de souris utilisées sera de 50 souris C57BL6 de 5 mois.

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

- Pour le Remplacement :

Il ne sera pas possible de remplacer cette étude par des stratégies *in vitro* et/ou *in silico*. Cette étude est préliminaire à une étude d'efficacité dans des modèles *in vivo* de maladies neurodégénératives.

- Pour le Réduction :

La taille des groupes a été déterminée pour assurer un nombre de réplicats suffisants pour l'analyse des échantillons biologiques par analyses biomoléculaires.

- Pour le Raffinement:

Le projet comprend des procédures visant à améliorer le bien-être des animaux : (i) la présence d'objets d'enrichissement, (ii) de l'anesthésie et de l'analgésie pré-opératoire, opératoire et post-opératoire (iii) 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 iv) l'accès à de l'enrichissement (papiers pour nids, tunnel en carton) et 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 conçue pour déterminer l'effet de candidats médicaments sur l'expression de gènes. Ce projet est préliminaire à une étude d'efficacité des candidats médicaments dans des modèles *in vivo* de maladies neurodégénératives.

**20138** La production de poulets standards repose sur l'utilisation de souches à croissance rapide et à fort rendement en viande. Ces animaux sont moins robustes vis-à-vis des pathologies éventuelles (exemple : colibacillose intestinale) ou des perturbations involontaires des conditions environnementales (exemple : stress thermique). Par ailleurs, la réglementation actuelle impose une diminution du recours aux antibiotiques lors de pathologies déclarées. Afin de renforcer les capacités de défense et d'optimiser la santé notamment intestinale de ces animaux plusieurs additifs alimentaires peuvent être utilisés. Des extraits d'algues riches en polyphénols et/ou polysaccharides pourraient avoir des effets bénéfiques de par leurs propriétés anti-oxydantes et antimicrobiennes. Ces extraits contiennent également différents oligo-éléments pouvant favoriser la croissance osseuse. L'objectif de la présente étude est de comparer des lots supplémentés avec des extraits d'algues à un lot témoin non supplémenté et à un lot témoin++ supplémenté en colistine (antibiotique utilisé dans le traitement de colibacillose) afin de quantifier les effets éventuels des extraits d'algues en relatif par rapport à ces témoins sur les paramètres qui seront mesurés. Sur un total de 1850 animaux commandés, 1824 seront élevés mais seulement 60 seront soumis à l'âge de 35 jours à une prise de sang pour déterminer le statut antioxydant global des animaux et la concentration circulante en lipopolysaccharides (LPS, marqueur de contamination éventuelle par des bactéries pathogènes). Il s'agira aussi d'analyser la réponse des poulets en termes de performances de croissance, de qualité de la carcasse et de la viande et de capacité anti-oxydante globale. L'impact des extraits d'algues sera également mesuré au niveau digestif (capacités anti-oxydante et antimicrobienne, morphologie) sur des échantillons de tissu et contenu intestinaux des différents segments.

Réduction : pour limiter le nombre d'animaux mis en élevage, l'expérimentation ne portera que sur des poulets mâles. Le nombre d'animaux mis en œuvre pour mesurer les différents paramètres est nécessaire et suffisant pour tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Les femelles produites simultanément par le couvoir seront destinées à des productions commerciales.

Remplacement : Compte tenu de l'objectif appliqué du projet en nutrition animale et zootechnie, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

Raffinement : les poulets seront élevés en groupes et feront l'objet d'une surveillance quotidienne par les animaliers qui ont l'expérience de l'élevage des volailles et de leur comportement. Le milieu sera enrichi avec des perchoirs en carton. Toute manifestation de symptômes comportementaux

persistants définis par un point limite (animal prostré plus de 24 h et ayant cessé de s'alimenter et de s'abreuver) entraînera le retrait de l'animal de l'expérimentation et son euthanasie.

**20139** Ce projet vise à étudier les effets à long-terme d'une exposition précoce à des contaminants environnementaux pouvant présenter une activité de perturbation endocrinienne chez le poisson-zèbre (*Danio rerio*). Alors que la reprotoxicité des perturbateurs endocriniens (PE) a été largement caractérisée, les mécanismes sous-jacents à leurs effets sur le système nerveux central sont encore méconnus. De plus, il a été montré que les stades embryo-larvaires étaient particulièrement sensibles à une exposition transitoire aux PE qui pouvait ainsi induire des effets persistant à l'âge adulte. Un premier objectif du projet est d'étudier la présence d'altérations comportementales en réponse à une exposition précoce à des PE sélectionnés. Divers traits comportementaux seront analysés : activité locomotrice, apprentissage, mémoire spatiale, exploration, sociabilité (et grégarisme), agressivité, anxiété. Un second objectif s'intéressera au rôle de l'aromatase cérébrale (aroB), une enzyme pouvant être à l'interface entre perturbation endocrinienne et effets neuro-comportementaux, avec l'utilisation d'une lignée transgénique de *D. rerio* dépourvue d'aroB. Les mêmes traits comportementaux que sus-cités seront analysés.

Le remplacement n'est pas possible de par l'analyse de traits comportementaux seulement quantifiables chez un organisme entier (adulte ici).

Le projet utilisera au total 900 poissons. Les effectifs ont été calculés afin d'avoir une puissance de détection suffisante des effets escomptés en se basant sur des expériences précédentes tout en réduisant au maximum le nombre d'individus via l'analyse de différents traits sur un même individu.

Pour limiter souffrance et angoisse, les animaux sont élevés en groupe dans des structures adaptées et exposés aux substances tests seulement aux stades embryo-larvaires à des concentrations n'induisant pas de toxicité aiguë. De plus, les observations suivantes, lorsque répétées ou persistantes pendant l'élevage ou les expérimentations sur un voire 2 jours selon le critère, entraîneront l'euthanasie d'un individu : déformation, hyperventilation, changement de couleur, modification du comportement de nage, immobilité au fond du bac.

**20140** 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 porteuse d'un variant récurrent du gène *KCNQ2* (T274M). La souris hétérozygote pour ce variant reproduit les caractéristiques principales de la maladie humaine. Ce modèle permet de mieux comprendre la pathophysiologie de la maladie et de tester de nouvelles approches thérapeutiques.

Les nourrissons humains qui présentent une épilepsie liée au gène *KCNQ2* sont traités avec de la carbamazépine, un anti-épileptique qui a démontré son efficacité pour supprimer les crises d'épilepsie. Cependant, on ignore si ce médicament a un impact sur le neurodéveloppement. Il existe d'autres traitements développés pour agir sur la protéine produite par le gène *KCNQ2*. Ces traitements doivent être validés dans un modèle animal relevant avant de pouvoir transférer ces connaissances vers la pratique en neurologie pédiatrique ou d'imaginer réaliser un essai clinique.

Dans ce projet, nous traiterons des souris *KCNQ2* T274M par différents composés pharmacologiques. Nous évaluerons la présence de crises d'épilepsie et le neurodéveloppement des animaux à la recherche d'un traitement qui permettrait de supprimer les crises d'épilepsie et de préserver le neurodéveloppement des animaux traités.

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 puisque notre projet demande d'évaluer des apprentissages et les capacités de mémorisation. Le passage par un modèle vivant est une étape indispensable avant d'envisager un essai thérapeutique dans l'espèce humaine. 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. La méthode d'administration des traitements est non contraignante. Des points limite clairs sont définis et les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront les critères d'interruption. Cette étude utilisera 900 animaux au total pour une période de 5 ans.

**20141** Le projet : Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du colon de type MSI (pour Microsatellite Instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome.

Nous avons identifié une mutation du gène CBF2 dans les cancers colorectaux (CCR) MSI, responsable de l'expression d'une forme mutante du facteur de transcription CBF2. Nos résultats démontrent que CBF2 est mutés dans environ 30% de cancers MSI du colon. Par des approches *in vitro*, nous avons démontré que cette mutation est de type perte de fonction. La mutation du gène est associée à un mauvais pronostic des patients atteint de cancer colique sous chimiothérapie.

Notre objectif est d'étudier le rôle de la protéine CBF2 dans la tumorigenèse MSI. Pour ceci nous comptons utiliser une souris transgénique CBF2 dont l'inactivation est inducible. Notre hypothèse est que la mutation de CBF2 pourra induire une modification du tableau clinique présenté par des souris transgénique Msh2KO (augmentation du phénotype tumoral, spectre tumorale différent, cancer plus agressif) et que cette mutation puisse rivaliser la mutation anti tumorale du gène HSP110 (oncogène impliqué dans la résistance à la chimiothérapie)

Les animaux:

\* Type : Ce projet impliquera l'utilisation de souris transgéniques sur fond génétique C57BL6/n.

\* Nombre: Le nombre d'animaux utilisés est de 384 souris pour une durée de 5 ans. Ce nombre est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

La conformité au principe des 3R :

\*Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement de la pathologie tumorale. Il est 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. 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.

**20142** Dans la situation sanitaire actuelle de pandémie provoquée par un coronavirus à la fois très transmissible et pathogène pour l'Homme, les vaccins disponibles semblent démontrer jusqu'à présent une efficacité de protection contre les formes graves de la Covid 19.

Cependant, l'émergence de variant du SARS-CoV-2 présentant une capacité de transmission plus importante est une menace grandissante. En effet, l'efficacité croisée des vaccins actuels reste encore à démontrer *in vivo* en particulier vis à vis de certains variants (Afrique du Sud : Bêta et Inde : Delta).

C'est dans ce cadre, que nous travaillons avec acharnement depuis juin 2020 et avons développé un candidat vaccin original, délivré par voie muqueuse intra-nasale.

Jusqu'à présent nous avons pu démontrer l'efficacité protectrice contre le développement de symptômes grave de notre candidat vaccin muqueux contre la souche originelle (Wuhan) du SARS-CoV-2, sur le modèle d'infection de référence souris C57Bl/6 exprimant le récepteur humain ACE2, récepteur majeur de la protéine S du SARS-CoV-2 présent sur les cellules épithéliales (notamment pulmonaires).

Egalement nous avons pu valider son efficacité en terme de protection contre l'infection sur le modèle de référence hamster doré.

Forts de ces premiers résultats et encouragé par un comité national d'experts très attentif au développement de notre projet, nous devons valider l'efficacité de notre candidat vaccin vis à vis des principaux variants circulants à l'heure actuelle. De plus, la population Française et mondiale bénéficiant progressivement d'une couverture vaccinale déjà avancée via les vaccins de première génération (Pfizer, Moderna, AstraZeneca...) nous devons évaluer l'efficacité potentielle de notre candidat en terme de rappel vaccinal, afin de (1) renforcer l'immunité déjà initiée par ces principaux vaccins du marché et (2) améliorer l'efficacité de protection contre les nouveaux variants.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de maximum 84 hamsters dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution qui pourrait restituer fidèlement un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les hamsters sont hébergés en groupes sociaux en accord avec la réglementation française et bénéficient d'un enrichissement social et physique (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger) dans la zone d'hébergement défini par la structure chargée du bien-être animal de l'établissement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une surveillance systématique de points limites.

**20143** Très récemment la maladie d'Alzheimer (MA) a été décrite comme une "oscillopathie", c'est à dire une pathologie qui induit des modifications importantes de l'activité électrique du cerveau. En effet, les neurones ont la particularité de communiquer entre eux en générant une activité électrique rythmique, leur synchronisation induisant les oscillations cérébrales. Ces activités oscillatoires du cerveau sont impliquées dans d'importantes fonctions cérébrales comme, l'apprentissage, la mémorisation, le sommeil ou l'élimination de protéines responsables de la MA. La photopharmacologie est une approche très innovante permettant de contrôler l'activité de médicaments par la lumière et ce de manière répétitive. Grâce à cette stratégie, il sera possible d'influencer l'activité rythmique des neurones. Cette activité sera mesurée par électro-encéphalographie (EEG) chez 218 souris transgéniques modèle d'alzheimer. Grâce à l'implantation d'un dispositif unique, nous pourrons effectuer les enregistrements EEG mais également

administrer les médicaments et les contrôler par la lumière. Des comportements évaluant la mémoire ou le bien-être des animaux seront également mesurés. Nous espérons par cette approche révolutionnaire et innovante obtenir une meilleure efficacité d'une nouvelle famille de médicaments, ainsi réduire les doses et par conséquent générer beaucoup moins d'effets secondaires.

Remplacement : il n'existe pas de modèle alternatif pour étudier le déclin cognitif observé dans la maladie d'Alzheimer.

Réduction: Le nombre d'animaux dans chaque groupe, ainsi que le nombre de groupes est basé sur une connaissance approfondie des modèles et de l'expérience acquise par notre équipe et a été déterminé par une analyse de puissance statistique basée sur nos études précédentes (G\*Power).

Raffinement: les animaux sont habitués à être manipulés pour éviter le stress. Le comportement général des animaux sera observé quotidiennement pendant toute la durée de l'expérimentation et des points limites seront établis afin de limiter le mal être ou la douleur

**20144** Les recherches menées au sein du laboratoire ont pour but de développer des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à un principe actif. De par la forte affinité de l'HBP pour le tissu osseux, celle-ci permet de vectoriser différents types de principes actifs vers le tissu osseux et ce dans le but d'augmenter les concentrations au niveau de l'os (pour les applications ciblées) et de diminuer les concentrations circulantes (pouvant être responsable d'effets secondaires). Cette vectorisation peut s'appliquer pour des molécules anti-cancéreuses (dans le cadre des tumeurs osseuses comme l'ostéosarcome), mais également pour des molécules anti-inflammatoires, antalgiques ou des agents utilisés en imagerie par exemple.

La molécule retenue pour cette étude associe un principe actif qui est un anti-cancéreux à une partie HBP modifiée. Ce composé a démontré *in vitro* (lignées cellulaires) et *in vivo* (dans différents modèles murins d'ostéosarcome) son efficacité antitumorale. Le développement pré-clinique d'une molécule qui inclut la recherche d'effets toxiques est un prérequis avant toute première administration à l'homme. Dans ce cadre, deux études de toxicité chez le rat ont été réalisées pour ce composé afin de déterminer la dose maximale tolérée (MTD : Maximum Tolerated Dose) après une administration unique et après des administrations répétées (3 cures à 3 semaines d'intervalle avec une période de recovery de 3 semaines après la fin de la dernière cure).

Suite aux derniers échanges avec l'autorité de santé Européenne (Scientific Advice demandé auprès de l'EMA) afin de valider des parties du plan de développement préclinique et d'anticiper la première administration à l'homme, des points restent encore à consolider, en particulier le devenir de notre molécule (le principe actif et ses principaux constituants) à long terme (au-delà de 3 mois) après administration chez l'animal. C'est pourquoi nous lançons une nouvelle étude de toxicité long-terme chez le rat (jusqu'à 9 cures administrées à 3 semaines d'intervalle avec et une période de recovery jusqu'à 9 mois après la fin de la dernière cure).

Le protocole inclura 6 groupes de 30 rats comprenant deux groupes contrôles (2 solvants testés), 1 groupe traité avec la molécule cible, 1 groupe traité avec la molécule de référence (le principe actif), 2 groupes traités avec les principaux constituants (vecteur et vecteur-adaptateur) de la molécule cible. 6 points de sacrifices seront prévus : 7 jours après la 3ème cure, la 6ème cure et la 9ème cure et ensuite 3-, 6- et 9- mois après la 9ème cure. A chaque temps de sacrifice 5 rats par groupe seront euthanasiés.

Remplacement : Aucune méthode alternative (étude *in vitro* par exemple) ne permet de reproduire l'ensemble des paramètres toxicologiques liés à un individu dans sa globalité. L'utilisation d'animaux est donc indispensable pour atteindre les objectifs de ce projet.

Raffinement : Les animaux seront stabulés dans des cages en plastique transparent de 1800cm<sup>2</sup> au sol et comportant une plateforme. Les cages seront ventilées individuellement, placés dans une pièce sous air conditionné, avec un cycle jour/nuit de 12 heures de lumière et 12 heures d'obscurité. Ils seront maintenus en groupe de 2 ou 3 rats par cage. Ils disposeront de matériel de nidification

(litière en chips de cellulose) puis d'enrichissement : les rats ont un tunnel rouge ainsi qu'un bâton de bois à ronger. Lorsque nous observons du stress ou lorsqu'un animal est isolé, un morceau de papier absorbant ou une bille en verre sera introduite dans la cage.

Réduction : Au total, 180 rats seront utilisés au maximum. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux par groupe et par point de sacrifice (n=5). Le traitement sera administré par voie intraveineuse. Afin d'évaluer la toxicité, différentes analyses et suivis seront réalisés pendant et à la fin du protocole comprenant le suivi et l'évaluation des signes cliniques, du poids des rats et de leur consommation alimentaire ainsi que des paramètres hémato-biochimiques et histologiques ; par ailleurs un suivi plasmatique du principe actif sera réalisé tout au long du protocole.

Au cours du protocole, des échantillons de sang seront prélevés à la veine jugulaire sur les animaux vigiles. Si le prélèvement est impossible (i.e. après 2 tentatives avec échec), il sera réalisé à la veine sublinguale sous anesthésie (5% d'isoflurane à l'induction et 2% au maintien).

Les jours de sacrifices, les prélèvements de sang seront effectués à l'aorte abdominale par exsanguination.

Pour ne pas prélever tous les rats à chaque temps et avoir suffisamment de délais entre deux prélèvements sur un même animal, nous avons fait le choix de ne prélever que 5 rats par groupe par temps. Ainsi les rats auront au minimum 3 semaines entre deux prélèvements de sang.

Les prélèvements seront réalisés à différents temps comme suit :

- entre 1 et 2 jours avant le traitement ;
- 2 jours après le traitement ;
- tous les mois après la dernière cure (seulement sur les groupes traités avec la molécule cible et la molécule de référence)
- les jours d'euthanasie.

Différentes analyses seront réalisées :

- Pour l'analyse par LC-MS/MS (détection plasmatique du principe actif libéré : Doxorubicine HCl) réalisée sur du plasma, les prélèvements sanguins seront réalisés avant et après traitement et le jour du sacrifice ; un volume de 500µl de sang sera nécessaire.
- Pour l'analyse hématologique/biochimique effectuée avant et après chaque cure et le jour du sacrifice, un prélèvement de 500µl de sang sera réalisé.
- Pour l'analyse par ELISA de la troponine C (marqueur de la toxicité cardiaque) effectuée après chaque cure et le jour du sacrifice, un prélèvement de 500µl de sang sera réalisé.

L'exsanguination sera réalisée au niveau de l'aorte abdominale sur animal anesthésié à l'isoflurane (phase d'induction à 5% et phase de maintien à 2%). Un volume maximum de sang sera prélevé et servira à l'analyse des paramètres hématologiques/biochimiques et les analyses LC-MS/MS et ELISA.

Ce projet constitue la dernière étape préliminaire aux études long-terme de toxicologie réglementaire répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation). Ce projet permettra, d'affiner le nombre de cure pour les futures études de toxicologie réglementaire long-terme, de comparer le profil toxicologique de la molécule d'intérêt à celui de la doxorubicine HCl en ce qui concerne la cardiotoxicité, de rassurer sur le devenir des principaux constituants (vecteur et vecteur-adaptateur) et de leur potentielle toxicité, et enfin de quantifier le devenir du principe actif (relargage du principe actif (doxorubicine HCL) à partir du réservoir osseux (site de fixation de la molécule d'intérêt) sur le long-terme. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques (ciblées avec un profil de toxicité plus favorable) aux patients atteints de tumeur osseuse (dont l'ostéosarcome).

**20145** L'immunothérapie anticancéreuse vise à stimuler le système immunitaire dans le but d'éliminer les cellules tumorales. Elle a connu un renouveau ces dernières années grâce à l'émergence des inhibiteurs de points de contrôle immunitaires qui sont désormais couramment utilisés dans

différents types de cancers (mélanome, cancer du poumon non à petites cellules, de la vessie, du rein, colorectal...). Cependant, ils ne sont pas efficaces chez tous les patients ; il s'avère donc nécessaire de développer d'autres stratégies d'immunothérapie. Dans cet objectif, ce projet consiste à l'expérimentation d'un protocole de vaccination novateur ciblant la protéine AEP (aussi appelée légumain) qui est retrouvée chez des cellules tumorales ainsi que des macrophages associés aux tumeurs ayant un rôle protumoral. Cette vaccination, dite « prime-boost », est basée sur l'utilisation des vecteurs de thérapie génique de type virus Adéno-associés (AAV). L'enveloppe du vecteur AAV sera décoré à sa surface par l'antigène d'intérêt vaccinal AEP, ce qui devrait permettre sa reconnaissance par les cellules immunitaires au moment de l'injection (« prime »). Le vecteur AAV véhicule en son sein un gène qui permet de produire ce même antigène AEP, qui sera alors synthétisé quelques jours après l'injection par les cellules infectées : l'antigène sera ainsi reconnu une seconde fois par le système immunitaire (« boost »). Cette stratégie pourrait permettre de stimuler une réponse immunitaire efficace en une seule injection, là où les protocoles de vaccination classiques en nécessitent au moins deux, une pour le « prime » et une/des autre(s) pour le « boost ».

Ce projet sera réalisé sur 3 ans.

Les objectifs de ce projet sont :

- i) de développer une vaccination dite « prime-boost » basée sur des vecteurs de type AAV avec un antigène modèle expérimental largement utilisés dans les études précliniques *in vivo* dans un premier temps, l'Ovalbumine (Ova).
- ii) d'adapter cette stratégie contre la protéine relevante AEP : la tester de façon prophylactique (en prévention du cancer) et thérapeutique. Cette étude se fera dans le modèle murin de cancer du sein 4T1.

Pour cela, nous utiliserons les méthodes et modèles expérimentaux suivants :

- i) des souris saines injectées avec des vecteurs AAV codant pour l'Ova ou AEP, dans un premier temps pour étudier l'efficacité de la vaccination « prime-boost » sur les réponses immunitaires en suivant celles-ci au cours du temps.
- ii) des souris injectées avec des vecteurs AAV codant pour l'Ova ou AEP et ayant été inoculées avec des cellules tumorales arborant l'antigène codé par les AAV. Les injections intramusculaires de ces vecteurs ainsi que l'injection sous cutanée des cellules tumorales sont réalisées sous anesthésie.

L'état général des animaux sera l'objet d'un suivi quotidien, de façon à évaluer l'atteinte de points limites mettant fin au protocole. Les expérimentations envisagées ici reposent sur l'utilisation de souris d'élevage. Les groupes expérimentaux envisagés comprennent 7 à 8 animaux par groupe, afin de pallier les variabilités inhérentes à ce type de modèles expérimentaux et permettre une analyse statistique fiable. Dans certains cas, les résultats devront être confirmés afin de s'assurer de la reproductibilité des expériences comme l'exige les standards scientifiques internationaux. Le nombre maximal de souris d'élevage utilisé dans cette étude est estimé à 960.

L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R :

**RAFFINEMENT** : Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée. Pour la limiter, nous avons établi une grille d'observation visant à définir des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et cadrant les mesures prises à l'apparition des premiers signes de douleur. Un enrichissement du milieu est également apporté par des abris de cellulose et des carrés de coton vierge.

**REDUCTION** : Une étude approfondie de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de l'absence de résultats publiés s'approchant des objectifs de notre étude. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences sera établi de façon à obtenir des résultats statistiquement significatifs.

**REMPACEMENT** : Il n'existe pas actuellement de modèle *in vitro* permettant d'évaluer les interactions entre les différents compartiments cellulaires (cellules du système immunitaire, cellules

tumorales, etc.). Ainsi, la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique à recours à un modèle animal.

**20146** Notre groupe développe des biothérapies innovantes applicables en cancérologie. Le projet propose une thérapie génique applicable à plusieurs cancers pour lesquels les thérapies conventionnelles ont une efficacité limitée (cancer du pancréas) ou dont la maladie métastatique est incurable (cancer de la prostate). Cette approche pourrait aboutir à une prise en charge de patients en impasse thérapeutique ou en soins palliatifs. Ce travail contribuera à l'établissement d'une preuve de concept de la pertinence d'une thérapie génique anti-cancer non invasive, potentiellement pan-cancer, et applicable aux tumeurs solides et/ou métastatiques de mauvais pronostic.

Pour cela, nous produisons des vecteurs viraux spécifiques des cellules tumorales pour transférer du matériel génétique induisant le détournement létal de voies métaboliques essentielles aux cellules tumorales, qu'elles soient dans la tumeur primaire ou dans les métastases. Le mode d'administration de la thérapie sera en intraveineux (considéré comme non-invasif chez l'homme) afin d'atteindre toutes les cellules tumorales dans la tumeur primaire ou ses métastases.

L'étude a pour objectif de d'abord tester *in vitro* les virus sur des lignées tumorales, non tumorales et des cellules primaires afin d'affirmer la spécificité de ciblage et l'efficacité de létalité avant de passer au modèle animal. La phase *in vivo* comprend 2 étapes. La première sur des souris xénogreffées en sous-cutané, procédure la moins invasive en recherche en cancérologie, servira à confirmer la capacité de ciblage des virus et à définir la dose optimale. La deuxième, impliquant des greffes dans l'organe cible (prostate ou pancréas) permettra de faire la preuve de principe de l'efficacité thérapeutique de notre biothérapie. Nous avons choisi de faire cette validation sur le modèle de souris dont nous possédons l'expertise, et qui est largement contributif en recherche en cancérologie. Ce projet implique de forcer le développement de tumeurs chez des animaux sains, mais permettra de tester une solution thérapeutique prometteuse, applicable rapidement chez l'homme, des essais thérapeutiques utilisant des solutions similaires étant en cours pour traiter des maladies génétiques héréditaires.

La stratégie expérimentale proposée respecte la règle des 3R. A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives suffisamment prédictives pour mimer le processus que nous souhaitons étudier, c'est-à-dire une efficacité thérapeutique à la fois sur des tumeurs primaires et des métastases de ces tumeurs. Les modèles cellulaires ou 3D actuels sortent les tumeurs de leur contexte physiologique, en particulier de la circulation sanguine, qui est la voie d'accès de notre thérapie aux cellules tumorales. 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.

Afin de réduire le nombre d'animaux, nous faisons des tests intensifs de la spécificité/efficacité virale *in vitro*. Puis, nous proposons une stratégie en plusieurs étapes successives, de la moins invasive à la plus invasive. Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par imagerie *in vivo*, ce qui limite grandement le nombre d'animaux à analyser. Afin de l'optimiser, une pré-analyse statistique a déterminé que 5 souris par groupe pour la détermination de la dose virale, et 10 souris par groupe pour la validation de l'efficacité anti-tumorale, étaient nécessaires 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. La bonne santé des animaux sera évaluée tout le long de l'expérimentation selon la législation actuelle par du personnel compétent. De plus, nous avons pensé le protocole en deux étapes. La première peu invasive (greffes sous-cutanées) permettra de valider la spécificité de la thérapie génique, la deuxième (greffes orthotopiques) fera la preuve de l'efficacité dans le contexte de la tumeur dans son organe

d'origine, ou des métastases. Ces greffes étant plus invasives, elles sont réalisées sous anesthésie avec un traitement analgésique adapté, renouvelé si besoin.

Pour réaliser l'ensemble de nos expériences nous demandons l'utilisation de 95 souris.

**20147** La quantification du stress animal est un enjeu fort dans de nombreux domaines comme l'élevage ou l'expérimentation. Le stress peut être mesuré par différents indicateurs comportementaux, physiologiques ou moléculaires, parmi lesquels le plus commun est le dosage du cortisol, une hormone libérée dans le sang chez les vertébrés suite à un stress. Le cortisol est classiquement dosé dans le plasma ce qui nécessite une prise de sang. Mais ces prises de sang sont impossibles à réaliser chez des animaux de très petite taille et il est nécessaire de sacrifier l'individu afin d'effectuer le dosage sur le corps en entier. Les poissons éliminent cependant le cortisol principalement par l'urine, ce qui offre l'opportunité de mesurer sa concentration dans l'eau, limitant ainsi l'impact sur le bien-être animal. Plusieurs études ont réussi à quantifier le cortisol dans l'eau contenant des poissons, mais ceci n'a été réalisé que sur quelques espèces modèles et la méthode reste à valider pour des espèces sauvages.

Si la détection de cortisol dans l'eau indique que le poisson vient de subir un stress, cela ne donne cependant pas d'informations sur les effets du stress sur les organismes. Quels sont les fonctions physiologiques affectées ? Tous les individus répondent-ils au stress de la même façon ? Pour étudier ces mécanismes, il existe des approches sans a priori tel que le RNAseq qui consiste à évaluer l'expression des gènes impliqués dans toutes les fonctions physiologiques de l'animal. En fonction des gènes qui sont plus ou moins exprimés après un stress, il est alors possible d'identifier les fonctions affectées et de mieux cibler les futures recherches.

Ce projet concerne les civelles d'anguille européenne qui remontent les estuaires pour atteindre les rivières et y grandir. Il est actuellement admis que certains individus ne migrent pas en rivière, se sédentarisant en eau saumâtre. Les raisons de cette migration facultative ne sont pas encore élucidées et l'enjeu est de taille puisque les civelles se sédentarisant donneraient plutôt des mâles tandis que les individus migrant en rivière se développeraient plutôt en femelles. Or de récents travaux suggèrent que les civelles présentant le plus de signaux de stress pourraient avoir une plus forte probabilité de sédentarisation. Par ailleurs, le stress des organismes peut être amplifié ou réduit par des contaminants présents dans l'estuaire. En général, la présence de polluants est vue comme une source additionnelle de stress pour les organismes mais parmi les contaminants, les anxiolytiques pourraient avoir un effet inverse. Leurs effets sur les poissons restent cependant mal connus car les mécanismes neurophysiologiques sur lesquels ils agissent chez l'humain ne sont pas forcément les mêmes que chez les poissons.

Afin d'étudier le rôle du stress et des anxiolytiques dans la migration des civelles, nous débutons un programme de thèse dont le premier volet sera de mettre au point des marqueurs de stress chez la civelle. Nous souhaitons développer une méthode d'analyse d'hormones de stress dans l'eau et identifier par RNAseq les gènes et fonctions physiologiques qui répondent le plus au stress.

168 civelles seront pêchées en entrée d'estuaire. Après acclimatation progressive à l'eau douce, nous utiliserons 84 bacs de 500ml d'eau aérée, chaque bac contenant 2 civelles. Au bout de 48h, une solution d'un anxiolytique (diazepam) à dose environnementale (environ 3 ppb) sera ajoutée à la moitié des bacs. Les 42 autres bacs serviront de témoins. Après 15 min d'exposition, les civelles de 6 bacs témoins (eau) et de 6 bacs contaminés seront euthanasiées par surdose d'anesthésie, puis pesées, mesurées et congelées. Sur ces 12 civelles témoins et ces 12 contaminées, 6 de chaque serviront aux dosages hormonaux et 6 à l'analyse RNAseq. Un prélèvement d'eau sera également effectué. La mise au point de la méthode d'analyse des hormones dans l'eau nécessite de sacrifier les individus afin de comparer les taux du cortisol produit par l'animal et libéré dans l'eau.

Sur les 36 bacs témoins et 36 bacs contaminés au diazepam restant, la moitié subiront un stress consistant à les agiter mécaniquement durant 2 minutes. Nous obtiendrons alors quatre traitements

de 18 bacs chacun : Témoin, témoin + stress, Diazepam et Diazepam + stress. Des échantillonnages de civelles et d'eau seront effectués 15,30, 60 et 120 min après le stress.

A T15 min, 6 civelles (3 bacs) de chacun des 4 traitements seront euthanasiés pour doser les hormones, à mettre en relation avec les dosages faits dans l'eau, et 6 civelles seront euthanasiées pour l'analyse RNAseq. A T30 min 6 civelles par traitement seront euthanasiées pour le dosage des hormones; à T60 min, le prélèvement sera identique à celui de T15 et à T120min, l'échantillonnage sera identique à celui de T30.

Le pic d'arrivée des civelles sur nos côtes va de novembre à avril avec des civelles de printemps en détresse énergétique par rapport à celles d'automne. Cette expérience concernera dans un premier temps des civelles d'automne mais le protocole sera ensuite appliqué sur des civelles de printemps car leur état physiologique pourrait augmenter le stress. Si les analyses de l'expérience d'automne peuvent être réalisées avant mars, le nombre d'individus utilisé au printemps sera réduit pour ne garder que les temps d'échantillonnage les plus pertinents. Le nombre total d'individus sera donc au maximum de 336 (168 à l'automne et 168 maximum au printemps).

Le remplacement (R#1) des animaux dans ce projet n'est pas envisageable car l'objectif est de mesurer le stress, qui s'exprime à l'échelle individuelle. De plus, la question globale portant sur la migration de la civelle d'anguille européenne, une autre espèce ne peut être envisagée. Pour réduire (R#2) le nombre d'individus impliqués dans notre projet, nous avons prévu n=6 pour chaque prélèvement, un nombre correspondant au minimum requis pour ce type d'analyse et observer la variabilité individuelle. Concernant le raffinement (R#3), les civelles seront pêchées manuellement par nos soins. Les aquariums seront alimentés en eau de ville déchlorée, aérée et enrichis de morceaux de paillason pour que les civelles puissent se cacher. La température de l'eau et la photopériode seront calées sur celles observées en moyenne en milieu naturel et maintenues stables tout au long de l'expérimentation. Les animaux seront observés quotidiennement.

**20148** Le but de cette étude chez le rat est d'analyser une série de nouveaux vecteurs viraux de thérapie génique quant à leurs capacités à transduire la rétine de rat et à exprimer une protéine reportrice (la Green Fluorescent Protein, GFP) dans les cellules rétinienne. Ces nouveaux vecteurs utilisés en recherche ou en thérapie clinique, dérivés de l'AAV ont été modifiés afin d'améliorer leur efficacité en terme thérapeutique. Ils pourront être utilisés par la suite comme vecteur de thérapie génique dans des pathologies dégénératives de la rétine. Cette étude est réalisée pour le compte d'une société de biotechnologie de stade clinique ayant pour objectif la recherche et le développement de médicaments pour les maladies rétinienne.

Le projet sera réalisé en respect de la règle des 3R : Remplacer, Réduire et Raffiner.

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 de la rétine en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles. 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 : 63 rats ont 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 en ophtalmologie. En effet, des travaux précédents (chez la souris aussi) ont permis d'établir les doses de vecteur à injecter et les temps d'analyses.

Raffinement: Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage/utilisation, et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe certifient le bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les rats recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance

**20149** 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.

Dans le cas de la forme héritable, cette maladie est majoritairement liée à une mutation 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, 20% des patients porteurs de la mutation vont développer des symptômes délétères de la maladie. Dans la forme idiopathique (sans cause apparente), de la maladie cette mutation génétique est retrouvée chez 11 à 40% des patients. Il a été ainsi proposé que la combinaison des risques génétiques et environnementaux contribue à une forme d'HTAP grave.

Dans ce projet, une lignée de rats génétiquement modifiée pour une mutation du gène d'intérêt *Bmpr2* 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 ont développé la maladie suite à l'injection de monocrotaline. La monocrotaline est un composé chimique conduisant à un remodelage du cœur droit et des vaisseaux ainsi qu'une inflammation à la périphérie des vaisseaux. Grâce à ce modèle de rats, il sera également étudié l'efficacité d'un traitement médicamenteux (un bêtabloquant, Nebivolol) pour soulager l'insuffisance du cœur droit.

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 de mieux comprendre les mécanismes du développement de la maladie et d'évaluer un traitement pour réduire les symptômes cardiaques. La mise en évidence des marqueurs biologiques par IRM cardiaque pourrait 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, cartographie optique, histologie, biologie moléculaire). Dans ce projet, 340 animaux seront utilisés, ce nombre est le nombre minimal nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables.

**20150** D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, qui est l'autorité directrice et coordonnatrice des Nations Unies spécialisée dans le domaine de la santé publique, les pathologies cardiaques représentent la 1<sup>ère</sup> cause de mortalité dans le monde en dépit des nombreux moyens thérapeutiques mis en œuvre. L'une d'elle, l'insuffisance cardiaque, correspond à l'incapacité du cœur à pomper suffisamment de sang pour répondre aux besoins de l'organisme. L'insuffisance cardiaque est notamment associée à des problèmes de production, de transport et d'utilisation de l'énergie, qui affectent le fonctionnement non seulement du tissu cardiaque mais également des tissus périphériques et particulièrement les fonctions musculaires. Le développement de nouveaux médicaments cardioprotecteurs représente donc un domaine majeur d'investigation.



L'objectif global de ce projet est d'étudier les mécanismes de régulation du stress du réticulum endoplasmique dans le cœur. Le réticulum endoplasmique (RE) est un compartiment de la cellule où se déroule la synthèse, le repliement et la maturation des protéines. Toute altération des fonctions du RE provoque une accumulation de protéines mal repliées dans le RE, une condition connue sous le terme stress RE. Des travaux récents ont montré que le stress RE est impliqué dans le développement de la majorité des pathologies cardiaques et notamment dans l'insuffisance cardiaque. Le stress RE lorsqu'il est modéré est considéré comme protecteur en déclenchant une réponse adaptative qui permet de restaurer le fonctionnement normal du RE. En revanche, lorsque le stress RE est sévère ou prolongé, un processus de mort cellulaire est déclenché afin d'éliminer les cellules cardiaques stressées, ce qui contribue au développement du dysfonctionnement du cœur. L'objectif actuel des recherches sur le stress RE en physiopathologie cardiaque visent donc non pas à inhiber totalement le stress RE mais plutôt à le moduler de manière à conserver son aspect protecteur et à empêcher le déclenchement de la mort des cellules cardiaques. Les précédents résultats de notre équipe ont montré que le stress RE sévère induit des modifications de la structure de la cellule cardiaque et de la fonction de ses mitochondries, qui sont les centrales énergétiques de cette cellule. De plus, nous avons mis en évidence que la protéine Sirtuine 1 protège le cœur en modulant la réponse au stress RE, faisant de cette désacétylase une cible thérapeutique de choix pour permettre la survie des cellules cardiaques.

Ce projet de recherche a donc pour but d'identifier de nouvelles molécules naturelles activatrices de la Sirtuine 1 dans le but de favoriser son rôle cardioprotecteur en condition de stress RE. L'utilisation d'animaux est indispensable pour l'évaluation de la fonction cardiovasculaire et ne peut être remplacée par des cultures cellulaires, les cellules cardiaques ne se divisant pas. De plus l'évaluation de la fonction cardiaque est à réaliser sur l'animal entier adulte afin de s'approcher le plus possible de la pathologie humaine. Afin de réduire un maximum le nombre d'animaux, certaines expériences seront réalisées sur des cultures primaires ou des lignées cellulaires. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement). Une planification minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en préservant la validité statistique de l'étude, et en conservant une puissance statistique suffisante pour observer un effet. Les fonctions cardiaques sont étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux. Les animaux sont euthanasiés en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés entre les domaines explorés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés.

Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour 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 1040 souris est nécessaire pour ce projet.

**20151** En région, la moitié de la surface agricole utile est cultivée par des exploitations céréalières sans élevage. Par ailleurs, la région compte 115 000 brebis. Les productions céréalières et ovines portent un enjeu commun : réduire les intrants. Coupler les deux productions vise à conforter le revenu et à réduire les impacts négatifs sur l'environnement. Ce projet a pour objectif de concevoir de nouveaux systèmes ovins bas-intrants qui mettent en œuvre des pratiques innovantes. Ces dernières valoriseront les complémentarités entre les productions végétales et ovines en réduisant les intrants à la fois pour les végétaux et les animaux. Elles mettront en avant les intérêts économiques, sociaux et environnementaux.

Le projet commence en 2021 et traite de l'étude de systèmes ovin (herbager, en polyculture élevage, et de céréaliers qui s'intéressent à introduire cette production) à bas intrants. L'étude porte aussi bien sur la baisse des intrants en production végétale (produits phytosanitaires) qu'en production ovine (concentré et traitement antiparasitaire).

Cette expérimentation système pose différents défis, notamment assurer l'affouragement des brebis d'une part (Pâturages ou apport a minima de foin provenant du système -Parcelle limitée et

défini en début d'expérience), d'autre part d'assurer le bien-être des animaux notamment en lien avec la gestion du parasitisme.

Cette expérimentation va donc consister à comparer 2 races différentes des berrichones de l'indre et des romanes comportant chacune (90 brebis + 20 agnelles + 6 beliers) soit 232 animaux au total. Les nématodes gastro-intestinaux affectent la santé des animaux d'élevage (mal-être important voire souffrance dans les cas les plus extrêmes) dès lors qu'ils ont accès au pâturage, entraînant également des pertes économiques importantes (baisse de production et coût des traitements antiparasitaires). Dans le cadre de cette expérience système, avec des brebis et agneaux de plein air, l'identification des animaux infestés naturellement par l'acte de pâturage et l'analyse du niveau seuil d'infestation nous semble important. Cette identification et analyse du seuil permettra ensuite l'application de traitement antiparasitaire quand de besoin et ainsi éviter des traitements systématiques favorisant l'émergence de vers résistants notamment chez *Haemonchus contortus* liées à l'utilisation massive des molécules antiparasitaires (sur le marché depuis des décennies).

Un contrôle du parasitisme est réalisé dans le cadre de cet essai par coprologie de mélange (pool de 10) sur l'ensemble des animaux (232) tous les 3 mois et prise de sang pour les groupes d'animaux présentant un nombre d'oeufs trop important pour adapter les traitements à l'animal.

Par ailleurs dans le cadre de cet essai 100% plein air, il est nécessaire de veiller au bien-être des animaux notamment en s'assurant du respect des 5 libertés (Ne pas souffrir de faim ni de soif, ne pas souffrir des contraintes physique grâce à des zones d'abris et de repos, être indemne de douleurs, blessures et maladie, avoir la liberté d'exprimer des comportements normaux et être protégé de la peur.

Lors de ce projet, la règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : Le cycle de développement d'*Haemonchus* ne peut se faire que par le biais d'animaux vivants. Aucune alternative existe.
- Réduction : La réalisation de coprologie de mélange tous les 3 mois sur les brebis et agneaux constituent le minimum d'échantillons nécessaires pour le suivi parasitaire. Il permet d'affiner le diagnostic par les prises de sang également prévues tous les 3 mois en décalé mais non nécessairement réalisées.
- Raffinement : Les actes sont pratiqués par du personnel formé et qualifié. Pour les coproscopies, un lubrifiant est utilisé pour minimiser la douleur lors du prélèvement des feces. Les prélèvements de sang sont réalisés à la veine jugulaire par du personnel qualifié. Les moutons seront tondus, si nécessaire, au niveau du cou pour une visualisation facilitée des veines. Il n'est pas possible de poser un cathéter chez les animaux maintenus en lot. Dans le cas rare où les animaux seront prélevés plusieurs fois de suite, il sera porté une attention particulière aux jugulaires. Une attention particulière sera portée pour repérer tout signe éventuel de phlébite. Les prélèvements seront faits alternativement à la veine jugulaire gauche et à la veine jugulaire droite. Un baume antiseptique et cicatrisant pourra être appliqué en massage sur les veines. Les animaux sont en plein air, en groupes pour éviter le stress de l'isolement social. Les animaux pourront se mettre dans des abris (3) déplaçables afin de les protéger contre les intempéries (Soleil, Pluie Froids...). Les animaux sont abreuvés par tonnes à eaux vérifiées quotidiennement. L'état des animaux est vérifié quotidiennement. Une note d'état corporel est donnée à chaque manipulation du lot. Les animaux contrôlés seront manipulés grâce à un parc de tri/contention mobile pour les prélèvements coprologiques et prise de sang.

**20152** Les personnes travaillant avec des animaux de laboratoire doivent maîtriser des gestes techniques plus ou moins complexes : administrations, prélèvements.... Leur formation initiale doit parfois être complétée par une formation spécifique, en fonction des études qu'ils seront amenés à faire et de l'évolution des connaissances et des pratiques.

Pour ce projet, nous prévoyons d'utiliser au maximum 300 souris sur une durée de 5 ans.

Dans la très grande majorité des cas, il s'agira d'animaux nés au sein de l'animalerie et non utilisés dans les projets de recherche car ne remplissant pas les critères d'inclusion : génotype, phénotype (sexe, âge...)

La personne en formation sera systématiquement accompagnée par une personne experte dont la maîtrise est reconnue pour le geste (diplôme et attestation de compétence validée par la SBEA). La formation se divisera en plusieurs étapes : formation théorique sans animaux, observation, réalisation sous une supervision directe.

Pour valider l'acquisition des gestes, la personne experte tiendra compte de critères de réussite et de critères de réalisation, définis pour chaque geste technique.

Remplacement : Pour ce projet, il n'existe pas de méthode de substitution, qui pourraient restituer fidèlement les comportements et réactions des animaux et/ou la manipulation des tissus vivants. Ces gestes étant très spécifiques de l'espèce, ils doivent être acquis chez l'espèce cible.

Réduction : Les animaux seront issus d'études antérieures ou d'animaux d'élevage destinés à l'euthanasie (car génotype ou phénotype non cibles) et utilisés pour plusieurs gestes techniques de ce projet lorsque ceux-ci sont compatibles.

Raffinement : Les animaux bénéficient d'un enrichissement social et physique dans la zone d'hébergement. Un suivi quotidien de l'état de santé des animaux sera réalisé avec une recherche systématique de points limites. Tous les gestes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale avec une analgésie ad'hoc.

**20153** Le trouble du comportement en sommeil paradoxal (TCSP) est une pathologie survenant pendant le sommeil et caractérisée par une absence d'atonie musculaire et une activité motrice anormale pendant le sommeil paradoxal (phase du sommeil pendant laquelle le sujet rêve). Cette pathologie concerne entre 1 et 3% de la population générale et elle est beaucoup plus fréquente chez l'homme que chez la femme. Le TCSP est aussi observé dans le cadre des syndromes parkinsoniens neurodégénératifs associés à une accumulation intracellulaire de la protéine alpha-synucléine (maladie de Parkinson, Atrophie multisystématisée) où il constitue un symptôme précoce qui précède de plusieurs années l'apparition des troubles moteurs. Le TCSP serait associé à un dysfonctionnement de plusieurs structures situées dans le tronc cérébral et impliquées dans la régulation des cycles veille-sommeil. Cependant, les mécanismes sont encore mal connus, notamment dans le cadre du TCSP qui apparaît comme signe précoce du développement d'un syndrome parkinsonien. Le but de ce projet est de déterminer l'implication de l'agrégation d'alpha-synucléine dans une structure du tronc cérébral (locus coeruleus) dans la physiopathologie du TCSP en déterminant si l'accumulation d'alpha-synucléine dans cette région du cerveau peut générer un TCSP et en identifiant les mécanismes associés. Une sur-expression d'alpha-synucléine au niveau du locus coeruleus sera réalisée par injection virale et le sommeil des rats sera suivi par télémétrie.

Ce projet nécessitera 168 rats et sera réalisé suivant la règle des 3R. Remplacer : ces approches nécessitant une analyse comportementale (sommeil), il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes alternatives à l'expérimentation animale. Réduire : Des études statistiques préalables nous ont permis de définir les effectifs nécessaires à la réalisation de ce projet de façon à mettre en évidence des différences significatives tout en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un suivi longitudinal est mis en place où chaque animal est son propre contrôle (mesures répétées permettant des analyses statistiques plus performantes). Un calcul de puissance statistique (niveau de signification de  $p < 0,05$  et une puissance de 0,8) a été utilisé pour minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives. Pour satisfaire à ces critères, ceci implique d'utiliser des groupes expérimentaux composés de 12 rats pour le suivi de la cinétique d'accumulation d'alpha-synucléine et de 18 rats pour les enregistrements du sommeil et les enregistrements électrophysiologiques. Raffiner : les expérimentations minimisent au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des animaux au cours des différentes procédures de ce projet (médication définie avec le vétérinaire référent et tests comportementaux basés sur le comportement spontané des animaux et ne nécessitant pas d'intervention directe de

l'expérimentateur). Lors des procédures les animaux bénéficient d'une prise en charge antalgique pré, per et post chirurgie et la présence d'un tapis chauffant. Les animaux sont hébergés en groupe de deux avec accès à la nourriture et à l'eau ad libitum et à un enrichissement (bâton de bois) leur permettant d'assouvir leur besoin naturel de rongement.

**20154** La flexibilité comportementale désigne la capacité d'un individu à adapter son comportement lors de changements de règles ou de situations de manière à effectuer des actions optimales (par exemple: changer de stratégie durant un jeu pour maximiser ses gains ou limiter ses pertes). Ce processus cognitif est altéré dans de nombreuses pathologies neurodéveloppementales et psychiatriques. La capacité à adopter des stratégies comportementales différentes en fonction de leur efficacité repose sur la comparaison entre le résultat escompté et le résultat obtenu. La sélection des actions se fait grâce à la connexion entre le cortex et le striatum. L'évaluation des conséquences de ces actions est assurée par les neurones dopaminergiques du mésencéphale projetant vers le striatum et le cortex. Ce projet vise à étudier les substrats neuronaux permettant de passer d'une stratégie à une autre lors de changements de règle lors d'un test comportemental de flexibilité chez le rat. Ces substrats neuronaux sont étudiés dans les zones d'intérêts grâce à l'électrophysiologie.

Ce projet nécessitera 520 rats et sera réalisé en application de la règle des 3R: Remplacer: Ces approches analysant le comportement de l'animal et l'analyse d'activités neuronales complexes, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier. Réduire: Des études statistiques préalables nous ont permis de définir les effectifs nécessaires à la réalisation de ce projet de façon à mettre en évidence des différences significatives tout en limitant au maximum le nombre d'animaux utilisés. De plus les analyses statistiques seront réalisées en mesures répétées. Raffiner: Nous mettons en place un suivi des animaux permettant de détecter toute forme d'inconfort, de douleur, de détresse ou d'anxiété de façon précoce ainsi qu'une stratégie pharmacologique comme par exemple lors de la procédure de chirurgie avec une prise en charge anesthésique et antalgique pré, per et post-opératoire, la présence d'un tapis chauffant et la surveillance des constantes vitales. Dès que possible, nous limitons l'intervention directe de l'expérimentateur, notamment en utilisant un test comportemental basé sur le comportement spontané de l'animal. Les animaux sont hébergés en groupe de deux avec accès à la nourriture et à l'eau ad libitum et à un enrichissement (bâton de bois) leur permettant d'assouvir leur besoin naturel de rongement.

**20155** Les aires visuelles présentes dans le cerveau sont organisées en sous-compartiments fonctionnels, orientés soit parallèlement (en couches), soit orthogonalement (en colonnes) à la surface corticale. Ces petits compartiments (~ 0,1 à 0,5 mm) permettent un traitement partiellement séparé des différents signaux (couleur, orientation, disparité, mouvement...). Il est crucial de comprendre leur architecture fonctionnelle détaillée et leurs interactions.

En raison de leur petite taille, ces unités fonctionnelles sont généralement étudiées via des technologies ex vivo mais peuvent aussi l'être *in vivo* par des technologies comme l'imagerie optique et l'électrophysiologie, qui sont très invasives. Ces techniques *in vivo* ne peuvent permettre qu'une couverture cérébrale très limitée. C'est pourquoi l'utilisation de l'Imagerie par Résonance Magnétique fonctionnelle (IRMf) pour étudier ces unités fonctionnelles à l'échelle mésoscopique présente un grand intérêt : elle est moins, voire non invasive, et permet des examens de l'ensemble du cortex, en combinaison avec des études de suivi chez les mêmes sujets. Cependant les structures colonnaires et laminaires restent difficiles à isoler à l'aide de l'IRMf conventionnelle, en raison de leur petite taille. De plus, le fait que différents processus activent différentes couches corticales, qui ont été révélées par l'IRMf, n'a jamais été évalué à l'aide de méthodes à résolution unicellulaire, telles que l'électrophysiologie et la microscopie.

Dans cette étude, nous souhaitons pousser la résolution spatiale de l'IRMf vers un niveau colonnaire et laminaire en combinant l'utilisation de scanners à haut champ et d'antennes de réception spécifiques conçues sur mesure pour chaque animal. Nous vérifierons ainsi la qualité des données

obtenues par IRMf à haute résolution en comparant celles obtenues dans les couches superficielles avec les données équivalentes en microscopie et électrophysiologie.

L'IRMf à ultra-haute résolution nous permettra d'aborder deux questions majeures des neurosciences. Premièrement, nous étudierons l'organisation fonctionnelle du cortex visuel des macaques à l'échelle mésoscopique et les mécanismes neuronaux fins de l'accès conscient (c'est-à-dire les corrélats neuronaux d'une expérience consciente), ce qui constitue un défi majeur pour les neurosciences fondamentales et cliniques. Dans un second temps, nous étudierons les mécanismes neuronaux sous-jacents à l'effet de l'ocytocine sur le comportement social des primates. L'ocytocine est un neuropeptide qui joue un rôle central dans la vie sociale des mammifères. Toutefois, nous savons encore peu de choses sur le rôle précis des voies de signalisation spécifiques de l'ocytocine dans les comportements sociaux chez les primates, en raison du manque d'outils d'administration de l'ocytocine spécifiques à chaque site. Dans cette étude, nous utiliserons l'IRMf à ultra-haute résolution combinée à l'ouverture de la barrière hémato-encéphalique (BHE) induite par les ultrasons focalisés (FUS). Il s'agit d'une nouvelle méthode que nous mettrons au point afin d'administrer de manière non invasive de l'ocytocine dans une partie spécifique du cerveau. Cette approche spécifique au site, en combinaison avec l'IRMf à ultra-haute résolution, permettra potentiellement d'étudier et de comprendre de façon approfondie le système ocytocinergique chez les primates. Cette compréhension ouvrira la voie vers de meilleurs traitements des dysfonctionnements des comportements sociaux (tels que l'autisme) chez l'homme.

Le fonctionnement cérébral et ses interactions avec l'ocytocine étant très complexe il est impossible d'utiliser des simulations informatiques pour tenter de le reproduire et nous devons donc avoir recours à l'expérimentation sur l'animal.

Aucun autre animal qu'un primate-non-humain (PNH) ne peut être utilisé pour les expériences proposées. En effet, pour que cette étude soit bien contrôlée, plusieurs conditions doivent être remplies : 1) l'animal doit être entraîné à effectuer des tâches comportementales complexes (fixation, saccade guidée visuellement et tâches d'interférence sociale). Il est documenté dans la littérature scientifique qu'aucun autre animal qu'un singe ne peut être entraîné à résoudre de telles tâches dans un délai raisonnable ; 2) l'anatomie des cerveaux des animaux autres que les PNH est très différente de celle du cerveau humain, ce qui limiterait considérablement la valeur de l'étude ; 3) le système ocytocinergique existe chez les souris et les rats, mais est sensiblement différent de celui du primate, ce qui fait des petits rongeurs des modèles inadéquats pour étudier le système ocytocinergique chez l'homme ; 4) les expériences prévues se sont concentrées sur un aspect important de la perception sociale : le traitement du visage et de l'expression faciale. Bien que les souris et les rats possèdent un cortex visuel, celui-ci ne contient pas de régions spécifiques du visage comme chez le primate. Il est donc nécessaire de mener les expériences avec une espèce de PNH.

Dix-huit animaux seront impliqués dans ce projet, tous issus d'élevages agréés et dédiés aux études scientifiques. Des expériences préliminaires, des tests statistiques, ainsi que l'étude de la littérature ont permis de réduire ce nombre au minimum nécessaire pour obtenir des résultats exploitables.

Les tâches comportementales prévues pour ce projet sont difficiles et nécessitent que les animaux soient à l'aise et concentrés. Ainsi, tous les procédures expérimentales doivent avoir un effet très limité sur le bien-être des animaux afin qu'ils puissent travailler sur ces tâches difficiles. De plus, les animaux seront hébergés en groupe afin de conserver un contact social proche de celui qu'ils ont dans la nature, et une large variété d'enrichissements auditifs, visuels, tactiles, et alimentaires seront mis à leur disposition, pour garder les animaux curieux et flexibles sur le plan cognitif. Enfin, l'état de santé des animaux sera contrôlé de manière régulière avec une attention particulière portée au bien-être animal, socialement et cognitivement. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par un vétérinaire avant d'être réalisés par une personne formées à celles-ci. Les paramètres physiologiques (pouls, fréquence respiratoire, tension, etc.) seront suivis continuellement pendant les examens.

**20156** Avec 44 872 nouveaux cas estimés en 2017 le cancer colorectal représente la deuxième cause de décès par cancer en France. Dans ce projet, nous chercherons à comprendre si certaines cellules immunitaires, appelées lymphocytes T régulateurs, sont capables de moduler le processus de tumorigenèse intestinale, nos données indiquant que la diminution du nombre de ces cellules réduit significativement l'initiation de lésions. Nous testerons cette hypothèse en utilisant une lignée murine inédite, qui permettra de moduler le nombre des lymphocytes T régulateurs durant les phases précoces de la tumorigenèse intestinale.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». (1) ce projet repose sur l'étude d'interaction entre différents types de cellules, voir entre des organes distants, impossible à reproduire *ex vivo*. (2) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries. Nous avons établi des points limites expérimentaux suffisamment prédictifs (signes précoces d'anémie, membres blancs), afin de réduire au maximum toute forme de stress. Nous utiliserons des anesthésiques afin de soulager les animaux lors des injections de médicaments (3) Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini selon une approche statistique rigoureuse permettant d'atteindre nos objectifs scientifiques et ainsi minimiser le nombre d'animaux à utiliser. De plus, nous utiliserons des animaux des deux sexes sans a priori, ceci permettant de réduire le nombre d'individus à produire.

Nous utiliserons 1 lignée transgénique, pour un total d'individu généré estimé à 200 individus sur 2 ans. Les souris engagées dans ces expériences seront soumises à un traitement médicamenteux visant à diminuer le nombre de lymphocytes T-régulateurs au tout début du processus de tumorigenèse intestinale, lorsque les lésions sont bénignes. Les résultats de ces expériences seront analysés par microscopie, en comparant le nombre de lésions présentes chez les individus traités ou non. Le suivi des animaux sera réalisé en contrôlant leur état et leur masse, selon des grilles de scores dédiées. Nous attendons de ce projet de pouvoir montrer, à terme, si le contrôle de la population des lymphocytes T-régulateurs ouvre la porte à de nouvelles pistes thérapeutiques.

**20157** Les cellules microgliales sont les cellules immunitaires du système nerveux central (SNC). Ces cellules 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 les cellules microgliales influencent en particulier la mise en place d'une classe de neurones inhibiteurs dans une région spécifique du cortex de la souris. De façon intéressante, un mauvais fonctionnement de ce réseau de neurones inhibiteurs a été observé dans les modèles murins des troubles neuro-développementaux dont on sait qu'un facteur de risque important est une inflammation périnatale. La microglie pourrait donc être le chaînon manquant entre inflammation périnatale, mauvaise mise en place des réseaux corticaux et apparition des pathologies cérébrales comme la schizophrénie et les troubles du spectre autistique.

Le but des expériences relatives à cette saisine est de tester i) si les cellules microgliales sont aussi impliquées dans le développement des neurones inhibiteurs dans d'autres régions du cortex ; ii) si mimer une infection virale pendant la période périnatale perturbent les activités du cortex contrôlées par ces neurones inhibiteurs. Nous utiliserons pour cela différentes lignées de souris transgéniques permettant de manipuler l'activité des neurones inhibiteurs du cortex ou de mesurer l'activité des cellules microgliales.

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. En effet, les propriétés de la microglie *in vitro* diffèrent de celles observées *in vivo* et, de plus, nous devons étudier le fonctionnement de réseaux neuronaux complexes qui ne peuvent pas être reproduits *in vitro*.

**Réduire** : Nous avons limité le nombre d'animaux au strict minimum déterminé par les tests statistiques. Le protocole choisi, déjà utilisé 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. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée, en cas de suspicion de souffrance, une évaluation sera faite grâce à une grille de score incluant le poids, l'aspect et le comportement. Des points limites (perte de poids supérieure ou égale à 20% ou dépassement d'un score déterminé sur la grille) en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux.

Le protocole chirurgical est réalisé sous anesthésie, avec un suivi post-opératoire. Les opérations de perfusion lors de l'euthanasie des animaux pour les études histologiques sont également effectuées sous anesthésie / analgésie profondes.

Ce projet nécessite dans son ensemble 672 souris.

**20158** Ce travail cherche à améliorer le traitement de l'inflammation aiguë articulaire (arthrite aiguë), en particulier de la crise de goutte mais aussi toute circonstance d'inflammation aiguë d'une articulation. Il est focalisé sur le développement de nouvelles formes d'administration d'un principe actif en utilisant des techniques de délivrance locale prolongée du médicament, et à associer un anesthésique local éventuellement pour obtenir une efficacité aussi rapide que possible sur les signes fonctionnels de l'arthrite. Nous utiliserons un modèle d'inflammation aiguë induite par la carragénine chez le rat. L'efficacité du traitement administré sera déterminée par l'évaluation des signes de douleur chez l'animal.

Cette étude se fera en accord avec la règle des 3R. Pour le remplacement, seul un être vivant sera capable d'indiquer la présence d'un signal douloureux, il n'est donc pas possible de remplacer cette étude par un modèle *in vitro*. L'utilisation du rat est donc tout indiquée dans cette étude. Pour la réduction, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum afin de permettre des analyses statistiques solides et une expérience préliminaire de faisabilité est prévue afin de limiter le nombre de groupes nécessaires à la validation de l'étude. Pour le raffinement, les rats seront hébergés dans des cages enrichies avec des tunnels et maintenus en groupes de 3 individus minimum. Des points limites destinés à limiter l'inconfort et la douleur des rats 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 137 rats au maximum sur 3 ans.

**20159** Lors des chirurgies du rachis, des saignements peuvent avoir lieu engendrant des hématomes. L'incidence de survenue d'un hématome postopératoire justifiant une réintervention est de l'ordre de 0,1 à 1%. Les conséquences de ces hématomes peuvent être dramatiques et engendrer des handicaps neuromoteurs pouvant être irréversibles. La formation aura pour but d'appréhender au mieux le contrôle de ces saignements (hémostase) en cours de procédure et l'intérêt du recours à l'utilisation d'agents hémostatiques limitants le saignement peropératoire en démontrant leur efficacité. Deux types d'opération seront minées. Cette formation concernera, au plus, une dizaine de chirurgiens.

Afin d'être au plus proche de la procédure chez l'homme, avec une 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 pour la ressemblance anatomique et physiologique de son rachis avec celui de l'homme. Cela 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 la formation pour leur permettre de s'habituer aux lieux et ainsi de diminuer leur stress. Ils sont logés dans la même case afin de respecter leur instinct grégaire. Les boxes ont une superficie de 5,3 m<sup>2</sup> avec une litière de copeaux de bois ou de paille et sont agrémentés de jouets pour le bien-être des porcs. En cas de température inférieure à 10°C dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. De plus, durant la procédure, la fréquence cardiaque est monitorée ainsi que le volume de sang perdu en cas d'hémorragie afin de s'assurer du bien-être des animaux et des points limites

concernant ces données physiologiques sont déterminés. En cas d'atteinte de ces points limites, la procédure est interrompue. Les interventions se déroulent sous anesthésie générale et les animaux sont mis à mort à la fin de la formation. Afin de réduire le nombre d'animaux impliqués, un seul animal sera utilisé pour chaque type d'opération qui sera simulée. Cette mesure permet de limiter à deux le nombre de porcs utilisés pour former la petite dizaine de chirurgiens.

**20160** Dans le cadre de la procédure de libération de lots de vaccins selon la Pharmacopée européenne (Ph Eur. et les rapports techniques de l'OMS. Chaque lot de vaccin doit être contrôlé avant sa mise sur le marché. Actuellement, les méthodes utilisées sont des méthodes épreuve de virulence sur cobayes ou souris pour les vaccins diphtérique (D) et tétanique (T), respectivement (vérification de la protection de vaccin contre l'effet des toxines diphtérique et tétanique) et une méthode sérologique sur souris pour les vaccins coqueluche acellulaire (Coq Ac). Cette étude a pour objectif de valider une méthode sérologique sur cobaye (décrite à la Ph Eu) pour le titrage de l'activité biologique des vaccins combinés DTCoqAc qui consiste en l'administration de vaccins à différentes doses, puis prélèvement de sang et dosage des anticorps spécifiques des 3 composés de vaccin. Application de la règle des 3'Rs:

Réduction: Les vaccins DTCoqAc seront administrés à un seul groupe d'animaux/lot de vaccin pour le titrage de l'activité biologique des 3 composés, le dosage des anticorps étant réalisé sur les mêmes sérums.

Raffinement: la méthode "épreuve de virulence" sera substituée par un prélèvement de sang sous anesthésie et analgésie, l'activité des vaccins seront déterminée par dosage des anticorps dans les sérums. Les animaux sont suivis individuellement et quotidiennement après l'administration des vaccins, des traitements pour ralentir et diminuer les lésions cutanées (dermaflon sur zone indurée et désinfection par vétédine en cas d'ulcération et dermaflon pour accélérer la cicatrisation). Les prélèvements sont réalisés sur animal anesthésié. Tout animal présentant des signes de souffrance (prostration, absence de toilette, apathie, perte de poids >20%) dont le score global sera supérieur à 6 sera euthanasié.

Remplacement : Actuellement aucune méthode validée n'est disponible pour le titrage de l'activité des vaccins DTCoqAc.

Les cobayes sont hébergés dans des cages enrichies de tube PVC servant de cachette ou de balles de foin. La nourriture et l'eau de boisson sont contrôlés et disponibles ad libitum. La validation de la méthode sérologique nécessite 490 cobayes.

**20161** Notre étude cherche à montrer qu'un nouveau mélange de microorganismes (formule confidentielle) pourrait avoir des effets très bénéfiques sur la santé du chien et ainsi être considéré comme des probiotiques. L'étude de tolérance à ce mélange a déjà été effectuée (aucun désagrément noté) tout comme une première étude d'efficacité. D'un point de vue réglementaire, une deuxième étude d'efficacité doit être réalisée.

L'objectif est de montrer la présence dans les selles, des microorganismes utilisés, de démontrer leur rôle en tant que stabilisateur du microbiote et éventuellement en tant qu'agent améliorant la digestibilité de l'aliment.

Ce projet s'inscrit dans le cadre de la thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'améliorer le bien-être des animaux de compagnie par des approches nutritionnelles ou pharmacologiques.

Deux groupes de 7 chiens (Beagle) seront utilisés après une période d'adaptation sur l'aliment de 21 jours durant laquelle ils sont hébergés en boxes collectifs.

Le premier groupe continuera à recevoir uniquement l'aliment tandis qu'une dose de probiotique sera ajoutée à la ration des animaux du deuxième groupe.



La supplémentation durera 30 jours durant lesquels les animaux seront individualisés dans des boîtes de 4 m<sup>2</sup> afin de recueillir cinq fois les selles de 24h ainsi qu'un pool de selles de trois jours consécutifs pour évaluation des coefficients de digestibilité.

Ils seront également individualisés, un jour, la semaine précédant la supplémentation et quinze jours après la fin de la supplémentation.

Des analyses sanguines (au début et à la fin de la période de supplémentation) seront réalisées (biochimie et numération formule) ainsi qu'un examen clinique complet.

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

Remplacer : Le chien 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 dont la puissance est suffisante pour pouvoir montrer un effet.

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.

**20162** La pratique d'une activité physique régulière est aujourd'hui reconnue pour avoir des effets positifs sur notre santé. En effet, elle représente un facteur majeur de prévention de pathologies comme les maladies cardiovasculaires, les AVC (accidents vasculaires cérébraux), le diabète, le cancer mais agit également sur notre humeur et sur les maladies mentales associées comme la dépression et l'anxiété. Cependant, avec le mode de consommation de notre société actuelle, la tendance mondiale va vers la diminution du volume d'activité physique quotidienne. Par conséquent, l'inactivité physique est devenue l'un des principaux facteurs de risque pour les problèmes de santé et est à l'origine de 10% de la mortalité totale (OMS, 2015). L'inactivité physique a pour origine principale une absence de motivation pour initier et/ou maintenir l'adhésion à un programme d'activité. Elle est souvent associée à des troubles du comportement alimentaire tels que l'obésité, dans laquelle la motivation pour la prise alimentaire est bien plus importante que celle pour l'activité physique ou à l'inverse, dans l'anorexie restrictive, où la motivation pour l'exercice l'emporte sur la prise alimentaire. Ces deux exemples de pathologies montrent l'importance d'étudier la motivation pour ces deux récompenses lorsqu'elles sont placées en concurrence. Des études précédentes, utilisant des procédures de conditionnement opérant, ont montré l'implication du système endocannabinoïde (SEC) dans la motivation pour l'activité physique et pour la prise de nourriture. Plus précisément, il a été récemment démontré que le principal récepteur cérébral des endocannabinoïdes ; le récepteur aux cannabinoïdes de type 1 (CB1), situé sur les neurones GABAergiques contrôlait la motivation pour courir, et ce même en condition de choix avec une autre récompense naturelle, la nourriture. Cependant, la localisation précise de ces neurones GABAergiques reste inconnue. L'aire tegmentale ventrale (ATV), région clé du système de récompense, est une région cérébrale riche en neurones dopaminergiques projetant sur le cerveau antérieur pour réguler les processus de motivation. A noter qu'il existe une relation linéaire entre le niveau de motivation pour l'exercice physique et l'activité des neurones dopaminergiques de l'ATV. Les neurones dopaminergiques de l'ATV ne possèdent pas de récepteurs CB1 mais sont inhibés par des neurones GABAergiques qui eux en possèdent. Ainsi, les endocannabinoïdes vont provoquer une levée de l'inhibition des neurones GABAergiques et vont de ce fait activer les neurones dopaminergiques, augmentant ainsi la motivation pour obtenir la récompense.

Le présent projet a donc pour objectif d'étudier l'implication des récepteurs CB1 des neurones GABAergiques de l'ATV dans la motivation pour l'exercice et dans le choix prolongé avec de la nourriture. A cette fin nous utiliserons des souris mâles et femelles mutantes pour le récepteur CB1. Ces souris seront soumises à une procédure de conditionnement opérant i.e. elles apprendront à introduire leur museau dans un orifice un nombre de fois prédéfini pour avoir ensuite accès à des croquettes et/ou à une roue d'exercice. Nous utiliserons au total 432 souris (âgées de 7-8 semaines

au début des expériences) sur 5 ans. L'espèce animale choisie est la souris, qui permet de mesurer l'impact de mutations génétiques de protéines d'intérêt (ici, le récepteur CB1). Dans ce projet, l'utilisation d'un organisme entier est nécessaire afin d'étudier la motivation pour une récompense et aucune méthode *in vitro* ou *in silico* ne peut donc la REMPLACER. En respect du principe des 3Rs, nous avons néanmoins optimisé le protocole afin de REDUIRE au maximum le nombre de souris utilisées : des tests de puissance statistique ont été employés pour calculer le plus petit nombre d'animaux par groupe nécessaire à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Ce nombre tient aussi compte du fait que les expériences seront réalisées deux fois de manière indépendante afin de s'assurer de la reproductibilité des résultats. En vue du RAFFINEMENT des procédures, un soin particulier est apporté aux questions relatives au bien-être animal. Les souris seront hébergées en cages individuelles dans une pièce dédiée avec régulation de la température, de l'humidité et de la luminosité. Le manque d'interactions sociales est compensé par un enrichissement des cages. Plusieurs procédures seront mises en place pour réduire au maximum la souffrance des animaux inclus dans le projet et un suivi quotidien des animaux sera effectué.

**20163** Pour ce projet d'une durée de 5 ans, un maximum de 16300 souris et 486 mini porcs sera utilisé.

Le but de ce projet est de développer un traitement pour la dysplasie spondyloépiphysaire congénitale (SEDC), une collagénopathie de type 2. La SEDC est une dysplasie osseuse génétique qui cause une forme rare de nanisme chez l'être humain. Elle est caractérisée par une petite taille avec un raccourcissement du tronc et du cou et s'accompagne d'un risque important d'instabilité au niveau des vertèbres cervicales pouvant induire une paralysie. Les patients souffrent également de problèmes oculaires et auditifs. Cette pathologie est due à des mutations perte de fonction dans le gène du collagène de type 2.

Ce projet sera réalisé en trois étapes. Nous utiliserons d'abord des souris et des mini porcs sauvages (non génétiquement altérés) pour réaliser des études de biodistribution. Cette étape a pour but de sélectionner des vecteurs potentiels qui ciblent la plaque de croissance, tissu sur lequel le médicament doit agir. La souris est utilisée dans un premier temps car elle permet une sélection rapide et le mini porc dans un deuxième temps car sa plaque de croissance est très proche de celle de l'homme. In fine, nous utiliserons un modèle de souris atteintes de SEDC afin d'évaluer l'efficacité du traitement. Il s'agit d'un mutant spontané à phénotype dommageable qui présente des symptômes similaires à la pathologie humaine (atteintes squelettiques, anomalies de la rétine, développement anormal de l'oreille interne). Nous apporterons une attention toute particulière à chacun des animaux de cette souche.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme à plusieurs niveaux. Actuellement, il n'existe pas pour cette maladie de traitement qui restaure une croissance osseuse et qui permette donc aux patients de grandir mais surtout qui élimine les complications dues à cette pathologie. De plus, cette maladie étant encore peu connue, ce projet nous permettra de mieux comprendre sa physiopathologie grâce au modèle de souris malades.

Afin de satisfaire aux exigences de remplacement, nous avons réalisé un screening *in vitro* des approches thérapeutiques à tester afin de ne tester *in vivo* que les stratégies présentant un potentiel thérapeutique élevé.

De manière à répondre aux exigences de réduction, nous allons utiliser des groupes contrôles en commun chaque fois que cela est possible. L'utilisation de la souris dans un premier temps nous permet de réduire le nombre de vecteurs à tester ensuite chez le mini porc et donc de réduire au final le nombre d'animaux nécessaires au projet.

Dans un but de raffinement, nous avons préalablement défini des points limites et des médicaments adaptés aux animaux utilisés et aux expérimentations pratiquées, ce qui nous permettra 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 et les animaux seront soignés en fonction de la sévérité de la douleur observée. Dès leur arrivée, les animaux seront hébergés dans des cages collectives pour les souris et individuelles sur litière pour les mini porcs avec un environnement enrichi et

adapté à chaque espèce (jouets, maisons, briques de bois à grignoter, contact visuel et olfactif entre les animaux, et interactions fréquentes avec les humains...).

**20164** Ce projet vise à comprendre comment des structures cérébrales, bien connues par ailleurs pour leur rôle dans le traitement des informations visuelles, participent à la construction de la représentation spatiale chez le rongeur. La représentation de l'espace constitue une question centrale dans le domaine de la recherche en cognition. Près de cinquante années de recherche en neurophysiologie, reposant pour l'essentiel sur l'utilisation du modèle rongeur, ont permis d'identifier les structures cérébrales indispensables à la construction de cette représentation spatiale. L'hippocampe est l'une de ces structures. Les études électrophysiologiques visent à essayer de comprendre le fonctionnement d'une structure cérébrale en analysant l'activité des neurones en relation avec le comportement de l'animal. Les principales cellules hippocampiques sont des neurones pyramidaux qui montrent une intense activité lorsque l'animal se trouve à un endroit particulier de l'espace dans un environnement donné. Ces cellules de lieu permettent donc collectivement à l'animal de savoir où il se trouve et dans quel environnement il se trouve. Nous savons désormais que l'activation de ces cellules repose sur des informations de nature multimodale (par exemple olfactive, tactile, visuelle, etc.) ce qui fournit au système de navigation un fort potentiel adaptatif. Néanmoins, les relations fonctionnelles entre les structures spécialisées dans le traitement des informations visuelles et celles spécialisées dans le traitement des informations spatiales restent très largement méconnues. Le but de ce projet est donc d'enregistrer l'activité neuronale hippocampique chez des animaux sains et des animaux dont le corps genouillé dorso-latéral (structure cérébrale sous-corticale) aura été lésé au préalable. D'une durée de 5 ans, ce projet nécessitera l'utilisation de 23 rats (mâles et femelles) de souche Long-Evans adultes. À la fin de ce projet, tous les animaux seront mis à mort par injection d'euthanasiant après sédation profonde.

Ce projet est conçu pour respecter au mieux la règle des 3R :

**REMPACEMENT** : La nature même des expériences proposées dans ce projet ne permet pas d'envisager de remplacement. En effet, ces expériences reposent sur l'exploration de l'environnement effectuée par les animaux en réponse à diverses manipulations environnementales et ne peuvent être réalisées à partir de modèles *in vitro*, *in silico* ou *ex vivo*. Ces expériences, du fait du caractère invasif des procédures de collecte des données (implantation d'électrodes intracérébrales) ainsi que des procédures lésionnelles (excitotoxicité induite), ne peuvent pas non plus être conduites chez le sujet humain.

**REDUCTION** : Ce nombre d'animaux est en accord avec l'ensemble de la littérature scientifique du domaine et a été calculé en fonction des exigences statistiques nécessaires au bon déroulement du projet.

**RAFFINEMENT** : La simplicité des procédures expérimentales mises en jeu dans ce projet nous permettra de réduire le temps d'expérimentation nécessaire à sa réalisation (de trois mois avec des techniques basées sur des microdescendeurs indépendants à deux mois au total pour le projet présenté ici). Les animaux seront hébergés dans des cages rehaussées (+7 cm) spécifiquement à cette occasion. Cette hauteur permettra aux animaux de pouvoir se redresser complètement dans leur cage sans que l'implant ne gêne leurs mouvements. Toutes les procédures chirurgicales seront effectuées à l'aide de produits anesthésiques et analgésiques adaptés.

**20165** La maladie lithiasique – appelée « lithiase » dans la suite du texte – consiste en la formation de cailloux, appelés « calculs », dans les voies urinaires. Elle concerne surtout le haut appareil urinaire (reins et uretères) chez le chat et l'homme (alors que chez le chien la lithiase concerne le bas appareil urinaire – vessie et urètre). Ces calculs sont à l'origine d'une obstruction brutale ou progressive des voies urinaires conduisant à un décès prématuré par insuffisance rénale aiguë ou chronique. La prévalence de la lithiase est de 8 à 10 % en médecine humaine et ne cesse d'augmenter ; cette même tendance s'observe en médecine vétérinaire comme nous l'avons montré

à partir d'une grande série de cas reçus dans notre service ; elle n'est pas observée chez le chien. Cette augmentation est spectaculaire ces 10 dernières années : la lithiase est désormais la deuxième maladie spontanée rencontrée chez le chat après les obstructions urinaires basses non lithiasiques (« Syndrome Urologique Félin »). Alors que l'insuffisance rénale chronique était autrefois une maladie touchant le chat très âgé, souvent après 14 ans, aujourd'hui, la plupart des chats qui meurent d'insuffisance rénale chronique dans un service d'urgences sont des chats relativement jeunes (8 ans) ayant une lithiase.

La maladie lithiasique est la maladie du chat du XXI<sup>ème</sup> siècle.

L'objectif de cette étude est de mieux connaître les raisons de cette épidémie et en particulier d'explorer la piste microbienne : un dérèglement du microbiote intestinal et/ou urinaire serait responsable de la progression de cette maladie. Ce phénomène serait lié au mode de vie de nos chats modernes.

Un recueil de selles ainsi qu'une prise de sang et une prise d'urine seront réalisés sur des animaux à jeun au maximum une fois par mois sur 30 chats de laboratoire (15 chats lithiasiques et 15 chats sains) durant 1 an (prolongation possible de 2 ans en fonction des résultats)

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 d'obtenir la puissance statistique nécessaire au test statistique.

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, d'urine et de selles de façon à limiter le stress chez les animaux.

Les animaux sont hébergés à plusieurs dans une grande pièce de vie qui bénéficie de recoins spécialement aménagés pour que les animaux puissent se cacher. Lors de la mise à jeun ou du recueil individuel de selles, les animaux sont placés en cages individuelles. Celles-ci sont enrichies par des griffoirs muraux et la présence de petits jeux du type billes à grelots et balle de ping-pong. Les animaux ne sont toutefois pas isolés puisqu'il y a plusieurs cages dans la même pièce, les animaux sont toujours en contact visuel. Les cages ont une surface de 1,5 m<sup>2</sup> à laquelle il faut ajouter celle de deux étagères de repos de 0,19 m<sup>2</sup>. La hauteur des cages est de 140 cm. L'avant et les côtés sont à claire-voie. »

Recycler : les chats seront gardés en vie à l'issue de l'étude et pourront soit être utilisés dans un autre protocole soit mis à la retraite.

**20166** A l'échelle mondiale, la proportion croissante de personnes souffrant d'un déséquilibre nutritionnel illustre la difficulté à maintenir un poids corporel normal stable dans nos sociétés contemporaines. Suivant les projections actuelles, de 30 à 85 % des femmes et hommes en âge de procréer seront obèses d'ici 2030-2040. Les données épidémiologiques montrant qu'une grande proportion des femmes enceintes sont obèses suggèrent une augmentation constante d'enfants exposés, in utero et au cours de leur développement postnatal précoce, à un environnement et une nourriture riche en calories. L'exposition à une mauvaise alimentation maternelle ou à l'obésité maternelle a un impact négatif sur la physiologie des enfants (obèses et non obèses) et pourrait être associé à des troubles certaines fonctions cognitives. Les études sur l'impact de l'obésité maternelle chez le rongeur montrent des altérations de la mémoire spatiale et de structures cérébrales qui lui sont associées, comme l'hippocampe. De plus, des données préliminaires, chez la descendance non obèse issue de mères obèses, montrent notamment une altération des propriétés des cellules de lieu de l'hippocampe, qui servent à se représenter l'espace, mais aussi des interneurons hippocampiques, suggérant une altération plus globale du fonctionnement de cette structure.

Ce projet vise à tester l'impact de l'obésité maternelle sur : les capacités mnésiques spatiales et, de manière plus fine, sur des capacités mnésiques plus intégrées (mémoire de référence, mémoire de travail, mémoire de type épisodique) de la progéniture non obèse adulte ; les capacités mnésiques résultant d'une interaction sociale ; les substrats moléculaires susceptibles de présenter une modulation épigénétique (tout changement d'expression des gènes qui n'implique pas de changement dans la séquence ADN, qui est stable mais demeure réversible), dans l'hippocampe et l'hypothalamus suite à l'exposition périnatale à l'obésité maternelle (durant la gestation et la lactation), par une analyse génétique.

Ce projet sera mené sur la progéniture adulte de souris femelles C57Bl6/J obèses adultes. Un total maximum de 130 animaux sera nécessaire (femelles pour reproduction + mâles géniteurs + progéniture). Ils permettront d'obtenir, pour le comportement, 14 individus pour le groupe contrôle (progéniture de mère non obèse) et 14 individus pour le groupe progéniture de mère obèse, à parité mâle et femelle. Ce nombre prend en compte le pourcentage d'animaux susceptible de présenter une résistance à l'obésité induite par l'alimentation (environ 30%), et la variabilité du nombre de souriceaux par portée (4-5 maximum chez souris obèses). La progéniture non utilisée pour le comportement servira à l'analyse génétique.

- Réduction : le même animal est utilisé dans l'ensemble des tests comportementaux et leurs cerveaux seront prélevés pour extraire l'ARN et permettre une analyse quantitative de l'expression de gènes cibles. De plus, l'utilisation de tests non paramétriques (si nécessaires) dédiés à l'évaluation de petits échantillons pourront être utilisés.

- Raffinement : Les mesures standards permettant une amélioration des conditions de vie des animaux seront déployées (enrichissement de la cage avec des copeaux et de tunnels ; plusieurs animaux par cage, sauf pour de courtes périodes en fonction des besoins du protocole ; accès ad libitum à l'eau et à la nourriture).

- Remplacement : ces études nécessitent un modèle animal afin d'induire une obésité et de tester des processus cognitifs.

**20167** Les adhérences sont une conséquence de la chirurgie abdominale et pelvienne avec une incidence postopératoire atteignant 90%. Elles sont responsables de douleurs chroniques associées à une 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 des 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 pour les patients et les chirurgiens et un fardeau pour le système général de santé.

L'utilisation de biomatériaux pour la prévention des adhérences post-chirurgicales a été démontrée efficace dans plusieurs modèles animaux. La récupération péritonéale se produisant dans les 3 à 5 jours suivant l'opération, ces biomatériaux 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 développé pour induire des adhérences sévères et s'est avéré d'une grande reproductibilité. Ce modèle sera utilisé pour cette étude comparative. Après approbation du comité d'éthique, 80 rats seront opérés sous anesthésie générale. Après 5 à 7 jours de cicatrisation, les animaux seront euthanasiés et la prépondérance des adhésions sera évaluée visuellement et par analyses histologiques des tissus abdominaux.

Cette expérimentation sera réalisée dans le respect de la règle des 3 R:

Remplacer: il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer l'effet de biomatériaux dans la prévention des adhérences post-opératoires.

Réduire: le nombre d'animaux a été calculé par l'utilisation d'un test statistique.

Raffiner: les animaux seront opérés par un chirurgien expérimenté et recevront des analgésiques en post-opératoire afin de diminuer la douleur. Les animaux seront hébergés par 2 sur copeaux en présence d'une cachette tube pour respecter leur sociabilité naturelle et diminuer leur stress éventuel.

**20168** Chaque année en France, 120 000 personnes sont hospitalisées pour un infarctus qui entraîne la perte d'une portion de tissu cardiaque, et 40 000 personnes décèdent des suites de cet infarctus. Un des moyens de diagnostiquer l'infarctus est d'effectuer un électrocardiogramme (ECG). Cet outil permet aussi de suivre les patients et de détecter l'apparition d'arythmies, une des conséquences les plus fréquentes de l'infarctus.

La fréquence cardiaque chez l'homme adulte est de 70/90 battements par minutes. Cette fréquence est de 100/120 battements par minutes chez le poisson-zèbre, et de 500 battements par minutes chez la souris. Plus proche de l'homme que la souris, le poisson-zèbre s'avère donc être un modèle de choix pour étudier ce paramètre cardiaque. Associé à la contraction cardiaque et sa vitesse, de nombreux paramètres associés à l'activité électrique cardiaque peuvent être mesurés grâce à l'ECG. L'objectif de notre projet est d'étudier les paramètres mesurables sur l'ECG du poisson-zèbre dans des conditions normales, après traitement pharmacologique, ou au cours de la régénération cardiaque.

Pour atteindre cet objectif, nous mettrons d'abord au point l'ECG chez le poisson-zèbre. Par la suite, nous étudierons l'effet de variations physiologiques (température et salinité de l'eau) ainsi que l'effet d'agents pharmacologiques connus pour moduler l'activité électrique cardiaque chez les mammifères. Afin d'optimiser la mesure d'ECG et les concentrations des quatre agents pharmacologiques que nous souhaitons tester, ainsi que pour réduire le nombre d'animaux utilisé par la suite, des poissons sont prévus pour la mise au point. Dans le cadre de l'étude des variations physiologiques et des traitements pharmacologiques, nous effectuerons 2 mesures espacées de 24h chacune puis les animaux seront mis à mort afin que leur cœur soit extrait pour faire une dernière mesure sur cœur isolé. Enfin, en adoptant une stratégie expérimentale combinant notre expertise de la régénération cardiaque chez le poisson-zèbre avec l'ECG, nous souhaitons étendre notre champ d'étude en caractérisant l'activité électrique cardiaque au cours de la régénération cardiaque chez des poissons sains, ou sur des lignées de poissons transgéniques. Notre approche vise à tester 10 lignées de poissons transgéniques exprimant des formes activées ou inactivées de gènes ayant été préalablement identifiés comme ayant un rôle potentiel au cours de la régénération cardiaque. Dans ce cas, l'ECG sera mesuré la veille de l'amputation cardiaque (résection de 20% du ventricule) puis de manière hebdomadaire après l'amputation. Au bout d'un mois, les animaux seront mis à mort et leur cœur sera prélevé pour compléter les données obtenues par des analyses histologiques.

Au total, 617 poissons seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

Cette approche s'inscrit en conformité de la règle des "3R".

Du point de vue du Remplacement, afin de conserver l'influence du système nerveux, ces mesures ne peuvent pas être effectuées sur organe isolé et nécessitent donc l'utilisation d'animaux vivants. Du point de vue de la Réduction, un groupe d'animaux est destiné à la mise au point afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires par la suite pour réaliser notre projet. Le nombre de poissons utilisés pour chaque procédure a été statistiquement estimé comme le nombre minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatif. Dans ce projet, chaque groupe est son propre contrôle puisque des mesures d'électrocardiogramme seront faites avant traitement/amputation cardiaque puis après. Cela permet l'utilisation de tests statistiques plus puissants et ainsi réduire le nombre d'animaux nécessaires. Enfin, nous utiliserons mâles et femelles sans distinction.

Du point de vue du Raffinement, durant l'enregistrement de l'ECG, les poissons positionnés sur le dos sont anesthésiés et maintenus immergés afin d'assurer leur respiration naturelle plutôt que par intubation. Au cours de la mesure, l'ECG sera utilisé pour évaluer si les points limites sont atteints et une fréquence cardiaque en condition contrôle inférieure à 60 battements par minute entraînera

l'arrêt de l'expérimentation et la réanimation (ou mise à mort si nécessaire) de l'animal. Nous utiliserons aussi une grille d'évaluation individuelle du bien-être adaptée au poisson-zèbre. Ainsi, nous évaluerons si l'animal nage bien au milieu du bac et de manière continue, sans mouvement ératique et si la prise alimentaire est normale. En cas de comportement interprété comme point critique, l'expérience sera immédiatement arrêtée et le poisson sera euthanasié conformément à la réglementation en vigueur. Des algues en plastique seront placés dans les bacs contenant des animaux isolés afin de limiter le stress lié à l'isolement. Enfin, le lot d'animaux utilisé pour la mise au point ne sera pas mis à mort mais plutôt réutilisé pour de la reproduction.

**20169** La schizophrénie est une pathologie psychiatrique d'origine neuro-développementale très invalidante, qui touche environ 1% de la population mondiale et dont le poids économique est très important. Elle est caractérisée par la présence d'un large spectre de symptômes cognitifs comme des troubles de l'attention et de la mémoire, l'incapacité à résoudre les problèmes du quotidien et la désocialisation. Les antipsychotiques actuellement disponibles traitent principalement les symptômes positifs (hallucinations, délires, paranoïa) et dans une moindre mesure les symptômes négatifs (anhédonie, manque de motivation, retrait social), mais ils sont inefficaces sur les symptômes cognitifs (difficulté à résoudre des problèmes, altération de l'attention, de la mémoire de travail). Améliorer leur prise en charge reste donc un enjeu important et passe par la mise au point de traitements précoces capables d'enrayer la progression de la maladie. Cette étude a pour objectifs de déterminer l'origine cellulaire et moléculaire de l'activation persistante de la voie mTOR qui est responsable de ces déficits cognitifs, en utilisant un modèle pharmacologique neuro-développemental de schizophrénie (injection de la phencyclidine à des souris au stade néonatal).

Nous tâcherons d'appliquer au mieux la règle des 3R tout au long de ce projet pour lequel nous utiliserons 2060 souris C57BL/6.

Remplacer: Une recherche approfondie sur Pubmed et Google Scholar a été réalisée afin de nous assurer qu'il n'existait aucune approche alternative *in vitro* qui aurait pu être utilisée pour reproduire les altérations de développement ou de maturation corticale provoquées dans notre modèle d'étude. Aucune solution alternative n'a pu être mise en évidence pour notre étude. En effet, les méthodes *in vitro* essentiellement basées sur les cultures cellulaires, ne permettent pas de maintenir l'intégrité des réseaux cellulaires et ne présentent donc pas les systèmes de communication multicellulaires nécessaires pour la réalisation de ce projet.

Réduire: nous essaierons au mieux de réduire le nombre d'animaux. Mâles et femelles seront utilisées sans distinction dans notre projet. Plusieurs informations seront également obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal.

Raffiner: Nous vérifierons que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales.

Enfin, en cas de circonstances imprévues dans lesquelles un des sujets montrerait des signes de détresse ou souffrance, une grille d'évaluation de l'état général de chaque animal sera remplie avec identification de points limites (poids de l'animal, état du pelage, comportement général: prostration de l'animal?) et prise en charge adaptée (poursuite de l'expérimentation, utilisation d'antalgiques si l'état de l'animal évolue ou euthanasie en fonction du score obtenu lors de l'évaluation de l'état général de l'animal).

**20170** Le stress thermique est une préoccupation environnementale majeure dans la production de volailles à travers le monde, et peut être déclenché par diverses conditions, telles que les conditions climatiques, la défaillance des contrôles de ventilation et de température (systèmes manuels ou automatiques, la densité de peuplement à la fin de la phase de croissance, et des systèmes de production nouveaux ou alternatifs (par exemple, en plein air, biologiques). Avec le réchauffement de la planète et le changement climatique, le temps chaud s'est prolongé et les vagues de chaleur sont plus fréquentes. Au cours de sa vie, une poule pondeuse peut passer par 1 ou 2 étés avec une exposition répétée au stress thermique. Il a été largement démontré que le stress thermique a un

impact négatif sur la santé, le bien-être et la productivité des poulets de chair et des poules pondeuses. Chez ces dernières, la température saisonnière affecte la production d'œufs. Lorsque la température ambiante dépasse 28°C, la production et la qualité des œufs diminuent et la mortalité augmente.

L'objectif de cet essai est d'évaluer différentes solutions nutritionnelles visant à améliorer la robustesse des animaux et maintenir les performances des poules pondeuses en situation de stress thermique. Ce projet portera sur 420 poules pondeuses.

**REMPLACEMENT** : Compte tenu de l'objectif final du projet et de l'absence de techniques *in vitro* permettant de répondre à cet objectif, le modèle animal ne peut être substitué.

**REDUCTION** : Un effectif de 420 poules nous permet de constituer 42 groupes de 10 poules. Ce design permet d'évaluer en même temps 4 stratégies nutritionnelles (témoin T, aliment avec valeurs nutritionnelles plus élevées NUT, T + mix additifs 1, et T+ mix additifs 2), deux avec 10 répétitions et deux autres avec 11 répétitions par traitement. Au regard de la variabilité de réponse, de la bibliographie et d'expériences précédentes, le nombre d'animaux et de répétitions est nécessaire et suffisant pour mettre en évidence des différences de performances (s'il y avait).

**RAFFINEMENT** : Les poules seront hébergées dans des parquets au sol sur des copeaux à une densité très inférieure au maximum autorisé. Les animaux auront la possibilité d'explorer, se percher et auront à disposition des nids et plusieurs enrichissements variés au cours de l'étude. Elles seront visitées 2 fois/jours y compris les week-ends. Un animal prostré, ayant cessé de s'alimenter et de s'abreuver sera euthanasié. Si l'animal présente une lésion ensanglantée ou une zone déplumée, il sera placé en infirmerie jusqu'à son rétablissement. Cette infirmerie sera un espace protégé par du grillage au sein de chaque parquet. En parallèle, les poules piqueuses seront identifiées et surveiller pour limiter tout risque de réapparition du picage.

S'il y a observation de signes cliniques tels que polypnée, prostration, yeux clos, plumage ébouriffé, absence de consommation alimentaire, amaigrissement, diarrhée, ceci entraînera une seconde observation rapprochée (1 à 2 visites quotidiennes supplémentaires) et conduira à la mise à mort de l'animal immédiate si les symptômes persistent.

**20171** Parmi les méthodes développées pour corriger certaines maladies génétiques sévères, les thérapies géniques constituent une avancée médicale majeure. Le traitement consiste à introduire dans l'organisme une copie fonctionnelle du gène déficient responsable de la maladie.

Les virus associés aux adénovirus (AAV) sont de petites particules virales non pathogènes qui sont devenues au cours des dernières années un outil sûr et efficace dans les thérapies géniques. Ils permettent de véhiculer une copie du gène « réparateur » au sein d'un organe.

Il existe plusieurs types d'AAV appelés « sérotypes », chacun montrant des capacités variables à être captés par les organes. Les sérotypes utilisés sont donc choisis en fonction des organes à cibler.

De par sa fonction dans le métabolisme, le foie filtre et contient une grande proportion du sang d'un organisme. Il n'est donc pas surprenant d'y retrouver d'importantes quantités de particules virales, après injection par voie intra-veineuse d'un vecteur thérapeutique. Ceci en fait d'une part une cible de choix facilement accessible pour la thérapie génique, mais aussi un site potentiel d'expression inappropriée du vecteur utilisé.

Bien que les AAV entraînent de faibles réactions immunitaires, le système du complément peut être activé suite à la reconnaissance d'une particule étrangère à l'organisme. Le complément consiste en une cascade de plusieurs éléments activés les uns par les autres et conduisant soit à la dégradation du corps non reconnu par l'organisme soit à sa neutralisation par des anticorps. Ainsi les particules d'AAV introduites peuvent être neutralisées ou captées par des cellules immunitaires suite à l'activation du complément avant d'avoir pu libérer le gène réparateur à l'organisme. Le foie est la principale source de composants du complément et des recherches ont mis en évidence un rôle inhibiteur du composant C4 du complément dans la transduction d'adénovirus dans le foie.



Le projet soumis découle de données obtenues au cours des expériences réalisées dans le cadre d'un projet visant à traiter l'hyperplasie congénitale des surrénales par thérapie génique (ci-après nommé « TG-HCS »). Sur une lignée de souris déficientes en 21-hydroxylase (CYP21) traitées par thérapie génique avec un AAV visant les glandes surrénales, l'étude de la biodistribution du vecteur AAV dans différents organes a montré des quantités importantes de copies du vecteur thérapeutique dans le foie des animaux possédant deux copies fonctionnelles de CYP21 (homozygotes « sauvages »), ou une copie fonctionnelle et une copie déficiente du gène (animaux hétérozygotes), contrairement aux animaux complètement déficients pour le gène (homozygotes déficients) (données non publiées). Hors, si la mutation de cette lignée touche principalement le gène de la 21-hydroxylase, elle affecte également une portion du gène du complément C4b, attenant au gène CYP21.

Le projet a pour but de confirmer l'implication du gène C4b dans la captation des AAV par le foie. Il s'agit dans un premier temps de confirmer un lien direct entre la présence du gène C4b et l'accumulation ou l'absence de copies du vecteur dans le foie.

Le vecteur choisi pour tester cette hypothèse (AAV5-CAG-GFP) possède un gène aboutissant à la synthèse d'une protéine fluorescente permettant de la localiser selon des techniques spécifiques. Il sera injecté à trois groupes de souris présentant chacun un des génotypes pour le gène C4b (homozygote sauvage, hétérozygote ou homozygote déficient). Le sérotype 5 est celui utilisé dans le projet TG-HCS et avec lequel nous avons obtenu nos premières observations. Si le rôle de C4b est confirmé, nous testerons d'autres types d'AAV (AAV1, AAV9 et AAV10-CAG-GFP) afin de mettre en évidence un effet du sérotype sur l'accumulation de copies de vecteur dans le foie. Pour étudier la persistance des AAV dans le foie, nous quantifierons les copies de vecteur 10 semaines après l'injection (temps auquel les premières données ont été obtenues lors de l'étude TG-HCS) et 20 semaines après l'injection (long terme).

Par ailleurs, chez la souris, le gène C4 a un homologue, le gène « Sex limited protein » (Slp), exprimé dans le foie et les reins des mâles adultes. Une étude montre un effet des androgènes (hormones mâles) sur l'efficacité de transduction des AAV dans les hépatocytes. Notre étude sera donc réalisée en parallèle sur des groupes de mâles et de femelles afin de déterminer si cet homologue joue un rôle dans le processus de transduction.

#### Remplacement

Il n'existe pas de lignées cellulaires d'intérêt nous permettant d'effectuer des études *in vitro*. Par ailleurs, tous les organes n'expriment pas le C4 à des niveaux similaires. Le foie est l'organe producteur majoritaire et l'intérêt principal étant de tester le locus C4 en fonction des trois génotypes possibles homozygote sauvage avec 2 copies fonctionnelles du gène C4b, hétérozygote avec une copie fonctionnelle et une copie déficiente pour C4b, et homozygotes « C4b déficient » avec deux copies déficientes pour C4b), la lignée murine C4b déficiente (B6.129S4-C4btm1Crr/J) est la plus adaptée à ce projet.

#### Réduction

Les effectifs prévus pour tester la transduction d'AAV ont été réduites au minimum, 1) en ne testant qu'une seule dose d'AAV, celle efficace et retenue pour l'étude TG-HCS et 2) en limitant le nombre de sérotypes à tester, nous n'utiliserons que ceux sur lesquels nous avons une première expérience et une efficacité prouvée dans nos études. Par ailleurs, nous nous basons sur la reproductibilité des résultats obtenus sur le foie dans notre projet TG-HCS pour restreindre à 5 le nombre d'animaux par groupe. Au total, 248 animaux seront nécessaires pour réaliser l'ensemble du projet.

#### Raffinement

Pour l'administration des vecteurs thérapeutiques, des protocoles anesthésiques et analgésiques adaptés seront mis en place selon la procédure et validés par le vétérinaire.

L'administration expérimentale (1 seule injection par animal) ainsi que les prélèvements sanguins se dérouleront sous anesthésie générale par isoflurane. L'application de critères d'arrêts et l'utilisation de points limites préalablement définis permettront de veiller au bien-être des animaux et d'anticiper toute souffrance.

**20172** 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 70% 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-types en fonction de la fonction affectée.

Du fait de l'hétérogénéité de la maladie de Willebrand, les traitements n'ont que très peu évolué depuis 30 ans. Les traitements qui reposent sur des concentrés plasmatiques substituant la protéine manquante ou non fonctionnelle imposent des infusions intraveineuses plusieurs fois/semaine et surtout ne prennent pas en compte les mécanismes physiopathologiques différents selon les types/sous-types de maladie de Willebrand. A l'heure actuelle, des traitements sur-mesure en fonction des différents types/sous-types n'ont jamais été développés.

Le but du projet est de tester l'efficacité de divers fragments d'anticorps à domaine unique, dérivés de camélidés (encore appelés nanobodies) afin de se substituer au facteur Willebrand dans des modèles murins de type 1 ou 2 de maladie de Willebrand. Ces nanobodies, de par leur versatilité, représentent des outils thérapeutiques très prometteurs, en particulier grâce à la facilité de générer des variants bi-spécifiques (2 nanobodies liés l'un à l'autre contre la même cible ou contre des cibles différentes).

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 différents nanobodies, il est crucial de pouvoir tester leur effet dans un modèle animal reproduisant une pathologie hémorragique, en l'occurrence la maladie de Willebrand.

Nous prévoyons d'utiliser 815 souris au maximum pour ce projet.

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.

**20173** Ce projet de recherche concerne le développement de stratégies thérapeutiques innovantes applicables à des pathologies d'origine traumatique dont aucun traitement à ce jour n'est disponible, ainsi que l'étude de la physiopathologie des traumatismes spinaux. Les lésions de la moelle épinière au niveau cervical sont relativement fréquentes chez l'homme, entraînant des problèmes au niveau locomoteur ainsi qu'au niveau du contrôle neural de l'activité respiratoire et cardio-vasculaire, représentant ainsi la première cause de mortalité chez les patients. Une restauration partielle spontanée de l'activité respiratoire, cardiovasculaire ainsi que locomotrice peut être observée après lésion incomplète au niveau cervical, principalement due à une réorganisation des projections synaptiques épargnées. Cette restauration fonctionnelle est relativement faible, il devient donc nécessaire d'améliorer nos connaissances sur la physiopathologie des traumatismes spinaux, et de développer des stratégies thérapeutiques innovantes en vue d'améliorer les activités motrices perdues chez les patients et d'éliminer l'assistance mécanique ventilatoire. Plus particulièrement, nous nous focalisons sur le développement et l'étude de traitements visant à améliorer la fonction respiratoire et cardiovasculaire après traumatisme de la moelle épinière en cervical.

Nous utilisons un modèle *in vivo* de lésion spinale cervicale chez la souris. Ce modèle est reproductible et limite le nombre d'individus requis pour obtenir des résultats statistiquement probants.

Les techniques que nous développons sur ce modèle sont de quatre ordres :

- Une approche pharmacologique pour modifier le métabolisme énergétique, afin d'induire des réponses moléculaires bénéfiques pour la restauration des fonctions atteintes.
- Une approche pharmacologique pour réduire l'inflammation par administration de beta-bloquant, afin de réduire les effets délétères de l'inflammation, responsables de l'aggravation de la pathologie (lésion secondaire).
- Une approche pharmacologique pour modifier l'environnement extracellulaire, afin de mieux comprendre les processus inhibiteurs de la plasticité après trauma spinal, et d'induire des réponses moléculaires bénéfiques pour la restauration des fonctions atteintes.
- Une approche de neuromodulation non-invasive par rTMS (stimulation magnétique transcrânienne) des neurones du cerveau et de la moelle épinière en vue d'améliorer le contrôle neuronal des fonctions ventilatoires et cardiovasculaires.

Afin de limiter le nombre d'individus, et dans le strict respect de la règle des 3R, nous utilisons des outils de diagnostic non-invasifs et non restreints, comme la pléthysmographie et l'échocardiographie doppler, afin d'avoir un suivi du même individu au cours du temps. Un suivi quotidien des animaux ainsi qu'un contrôle de la douleur sera pris en compte en utilisant des antidouleurs en chronique. De plus, nous incluons nos animaux dans différentes procédures expérimentales légères afin de réduire le nombre d'animaux en évitant l'utilisation de divers groupes distincts lors des études temporelles.

Un nombre total de 2710 animaux sur les 5 années du projet sont nécessaires à sa réalisation. Une connaissance de l'application de ces divers traitements ainsi que de l'efficacité de ceux-ci permettront une meilleure compréhension de leur efficacité, et pourraient aboutir à l'élaboration d'un traitement pour les patients souffrant de traumatismes spinaux.

**20174** Les déficiences intellectuelles (DI) constituent un problème médical et socio-économique majeur en raison de leur forte incidence dans la population (de 1 à 3%) et elles représentent plus de 10 % des dépenses totales de santé dans la plupart des pays européens. Plus de 1300 gènes ont été décrits ayant une implication dans les déficiences intellectuelles. Jusqu'à présent, les études fonctionnelles ont été limitées à quelques anomalies génétiques uniques. Nous proposons une approche globale de biologie systémique afin d'obtenir des informations sur les mécanismes conduisant à un dysfonctionnement cognitif chez l'homme.

Dans ce contexte, et dans le cadre d'un appel d'offre, notre projet portera sur la sélection des mutations génétiques associées à la déficience intellectuelle, aux troubles autistiques et à la schizophrénie, sur la base des données cliniques, et d'étudier les modèles de souris portant ces mutations afin de comprendre les bases moléculaires au niveau des cellules nerveuses et comprendre les mécanismes impliqués dans les troubles de mémoire. Nous appliquerons une large batterie de tests comportementaux pour évaluer les différentes fonctions cognitives et neurologiques.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction du nombre d'animaux utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante:

(1) REDUCTION: Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Ainsi, dans le cadre de ce projet (établi pour une période de 4 ans), notre objectif est d'étudier 10 lignées de souris. Nous utiliserons 12 mâles mutants, 12 femelles mutantes, 12 mâles contrôles et 12 femelles contrôles par lignée. Donc au total 480 souris au maximum.

(2) RAFFINEMENT: Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront hébergés dans les meilleures conditions possibles dans un environnement contrôlé permettant une réduction du stress. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. Les animaux seront pesés et observés toutes les semaines avec une grille de suivi du bien-être, en plus du suivi quotidien habituel.

(3) REMPLACEMENT: l'approche animale se justifie par l'étude comportemental sur l'organisme entier pour compléter l'exploration de la cellule à l'animal. De plus, les tests de mémoire nécessaires ne permettent pas de remplacer l'utilisation des animaux par des méthodes *in vitro*.

**20175** Le syndrome de Costello (CS) apparaît dans les premiers mois de la vie et se caractérise par un retard de croissance postnatale, des traits épais, un déficit intellectuel et des altérations au niveau de la peau, des muscles et du cœur. Environ 60% des malades souffrent de troubles cardiaques responsables du décès de nombreux enfants.

Notre objectif est d'élucider les mécanismes responsables du syndrome de Costello causés par une mutation dans le gène HRAS, et d'apporter des solutions thérapeutiques pour limiter le développement de troubles cardiaques chez le jeune enfant et chez l'adulte. Pour atteindre ces objectifs de recherche fondamentale et médicale nous disposons d'un nouveau modèle murin de la maladie. Ce modèle a fait l'objet d'une première analyse qui a révélé une hypertension associée à une accélération du rythme cardiaque et le développement de troubles de la fonction du cœur. La souris mutée présente aussi une faiblesse musculaire généralisée et des anomalies au niveau du métabolisme énergétique.

Ce projet vise à évaluer l'effet d'un médicament déjà autorisé chez l'homme en combinaison avec un composé naturel, sur les fonctions cardiaque et musculaire dans la souris modèle du syndrome de Costello. Ces molécules rétablissent notamment certains défauts métaboliques comme ceux observés dans la souris Costello. Afin de pouvoir envisager l'utilisation de ces produits en clinique humaine dans le traitement du syndrome de Costello, nous devons évaluer leurs actions sur un modèle de la maladie (*in vivo*), une synergie étant attendue entre les deux produits. Pour cela, le modèle murin du syndrome de Costello dont nous disposons est indispensable et parfaitement adapté à nos besoins.

Ce projet s'inscrit donc dans une recherche thérapeutique contre les maladies rares avec des implications à plus long terme en santé humaine.

Ce projet a été préalablement évalué par les instances scientifiques de l'ANR qui l'ont financé. La présente saisine comporte ainsi des implications à la fois sur le plan fondamental pour la compréhension du rôle biologique du gène HRAS mais aussi en santé humaine dans le cadre des maladies rares et de leur traitement.

Remplacement :

Le modèle Souris permet d'étudier de manière complète le système cardiaque, tel qu'il peut être affecté chez l'Homme. Nous ne pouvons pas réaliser ce type d'étude dans des modèles *in vitro* ou *in silico*, car la complexité du système cardiaque n'est actuellement pas reproduite par ces outils. Il est donc indispensable de travailler sur un modèle murin car la cardiomyopathie est une maladie d'adaptation du cœur au sein d'un organisme.

Réduction :

Nous avons besoin pour réaliser l'ensemble de nos expériences d'un total de 128 souris. Le nombre d'animaux utilisés sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Par ailleurs, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, les animaux contrôles non traités seront mutualisés sur l'ensemble des traitements, individuels ou en association.

Raffinement :

Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Pour cela un suivi quotidien sera réalisé par le personnel de l'animalerie et

un enrichissement des cages sera proposé à l'aide de nids afin de réduire le stress et satisfaire les instincts naturels de la souris. Les souris seront hébergées en cages ventilées et suivies quotidiennement pour détecter d'éventuels signes cliniques. Durant les procédures expérimentales, tous les efforts seront entrepris pour minimiser le stress encouru, pour limiter la douleur et la contrainte qu'elles imposeront aux animaux avec un recours à l'analgésie et/ou l'anesthésie ainsi qu'à des temps de récupération entre chaque procédure permettant d'éviter un effet cumulatif. Notre projet prend ainsi en compte le respect des animaux et la participation aux conditions d'enrichissement dans les cages.

**20176** Une « horloge biologique » capable de mesurer le temps et de préparer l'organisme aux variations environnementales cycliques est une propriété fondamentale du vivant. Chez les mammifères, des cellules rétinienne spécialisées détectent la lumière et transmettent l'heure environnementale vers une « horloge circadienne centrale », qui à son tour synchronise les « horloges périphériques », présentes dans pratiquement toutes les cellules de l'organisme. Ces « horloges » sont des réseaux des gènes en boucles rétroactives. Elles permettent la synchronisation de notre physiologie avec l'heure de la journée, de préparer l'organisme aux phases d'activité et de repos. Les cellules rétinienne impliquées ne sont pas les photorécepteurs classiques, cônes et bâtonnets, mais des cellules ganglionnaires exprimant un pigment visuel particulièrement sensible à la lumière bleue.

Les sources lumineuses de notre environnement font de plus en appel à des LEDs (« light-emitting diodes »), économes en énergie mais émettant fortement dans le bleu. Il y a ainsi une surexposition nocturne, à travers l'éclairage artificiel et l'utilisation d'écrans jusqu'à des heures tardives. En sens inverse, le style de vie contemporain sédentarisé où nous passons l'essentiel de notre temps à l'intérieur fait que nous sommes souvent sous-exposés à la lumière solaire durant la journée. Ceci provoque une perturbation chronique de l'horloge centrale, qui à son tour dérègle la rythmicité des organes périphériques et, de façon générale, notre physiologie. Les conséquences immédiates sont insomnie et fatigue. A plus long terme, une perturbation chronique de l'horloge pourrait jouer un rôle dans le développement de problèmes de santé majeurs tels que le diabète, l'obésité, l'hypertension artérielle ou le cancer, ou de maladies neurodégénératives telle que la maladie d'Alzheimer.

Comprendre les mécanismes impliqués dans la désynchronisation de l'horloge circadienne est indispensable pour mieux caractériser les risques sanitaires associés et pouvoir les prévenir. Les enjeux à plus ou moins long terme liés à cette question sont à la fois d'ordre économique (réduction des coûts de la prise en charge des pathologies associées à la désynchronisation circadienne, développement de systèmes innovants d'éclairage ou de prévention des risques) et sociétal (bien-être et santé de la population).

Le projet consiste à étudier l'impact de l'exposition de la lumière en soirée sur la physiologie rétinienne et l'horloge circadienne. L'utilisation d'un modèle animal permettra d'étudier les interactions/connexions complexes qui s'établissent entre rétine et horloges circadiennes et les effets potentiellement pathologiques qui en résultent. Les modèles rongeurs classiques, rats ou souris, ne sont pas pertinents car ce sont des animaux nocturnes. Nous utiliserons à la place un rongeur diurne, *Psammomys obesus*, appelé rat des sables. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été calculé afin de permettre la validation statistique des résultats, en fonction des effets escomptés. Les expériences proposées ici viennent compléter celles décrites dans un projet d'ores et déjà accepté, sans impliquer d'animaux supplémentaires. Trois groupes expérimentaux de 12 animaux chacun (36 animaux au total) seront exposés pendant 8 mois respectivement (1) à une lumière « contrôle » correspondant aux conditions habituelles d'animalerie, (2) à une lumière artificielle en début de nuit avec une forte composante bleue, (3) à une lumière artificielle en début de nuit sans composante bleue. Dans le projet initial, une prise de sang est effectuée avant et après la période d'exposition, et un électrorétinogramme est effectué chaque mois. Nous souhaitons compléter le projet initial en incluant dans l'étude un suivi ophtalmologique longitudinal (début, milieu et fin d'exposition), avec des techniques d'imagerie rétinienne sans contact : tomographie par cohérente optique (OCT) et fond d'œil couleur / angiographie, identiques à celles utilisées chez l'homme. Ceci permettra de corrélérer la structure

rétinienne et/ou d'éventuelles atteintes du réseau vasculaire avec les données fonctionnelles (électrorétinogrammes) et moléculaires (dosages sanguins, analyse post-mortem).

L'immobilité des animaux pendant les examens sera obtenue avec une anesthésie gazeuse, de préférence à une anesthésie par injection, afin de minimiser le temps d'inconscience des animaux. Le suivi longitudinal permet de limiter le nombre d'animaux, tout en augmentant la puissance des tests statistiques.

**20177** Les troubles du spectre autistique (TSA) touchent une personne sur 100. Il s'agit d'un trouble neurodéveloppemental caractérisé par des anomalies de la communication sociale ainsi que des comportements stéréotypés et des intérêts restreints. Un des projets de l'équipe consiste à étudier les traits assimilés aux TSA dans des syndromes associés à des anomalies chromosomiques entraînant des changements du nombre de copies de gènes (par exemple : syndrome de Down, syndromes de délétions et duplications 16p11.2 et 17q21.31).

L'équipe dispose de modèles de souris et de rats transgéniques pour étudier les mécanismes de ces TSA. Les nouveaux outils récemment développés pour suivre le comportement social de la souris sont maintenant fonctionnels. Le présent projet vise à mettre en place l'équivalent de cet outil de suivi comportemental pour les rats. Cette approche permettra de limiter l'influence de l'expérimentateur sur les mesures comportementales et donc d'obtenir des mesures plus robustes et très complètes pour chaque animal.

Réduction : Le nombre de rats utilisés est réduit à son minimum pour permettre de valider le système de suivi comportemental et obtenir un aperçu solide de la diversité comportementale présente chez les deux lignées explorées. Ainsi, dans ce projet, un total de 32 animaux (16 mâles et 16 femelles) sera utilisé. Les analyses réalisées permettront d'optimiser les caractérisations comportementales qui auront lieu sur des modèles transgéniques et ainsi éviter des duplicatas d'études.

Raffinement : Le marquage des animaux est réalisé sous anesthésie et après application d'un anti-douleur local. Après opération, les rats seront surveillés quotidiennement pendant trois jours pour vérifier la bonne cicatrisation. Les animaux seront hébergés au minimum par paire, dans des cages permettant l'accès à du matériel pour ronger et pour la confection d'un nid.

Remplacement : L'utilisation de mammifères est indispensable car aucune méthode *in vitro* ne permettrait d'étudier les TSA, qui ne sont diagnostiqués que sur la base comportementale car pour le moment aucun marqueur physiologique n'est suffisamment robuste. Le choix du rat est fondé sur la possibilité d'examiner des fonctions cognitives complexes qui ne peuvent être observées chez la souris, telles que la collaboration ou l'empathie.

**20178** L'initiation des cancers colorectaux humains est souvent liée à des mutations touchant le gène *Apc*. Notre programme de recherche se propose d'explorer les premières phases d'apparition des tumeurs intestinales, en utilisant un modèle de souris possédant une mutation de ce gène, ces animaux développant de manière spontanée des lésions au niveau de l'intestin grêle et du colon. Ce modèle est en effet particulièrement pertinent pour étudier l'initiation tumorale du tractus intestinal, et récapitule de manière remarquable la Polypose Adénomateuse Familiale, une maladie héréditaire humaine se caractérisant par l'apparition de nombreux polypes évoluant en cancers.

Ce projet sera mené selon les modalités du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrit au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R »). (1) Remplacer : L'étude de l'initiation tumorale est un phénomène complexe, non reproductible *in vitro*, impliquant l'utilisation des souris transgéniques comme un modèle intégré, car faisant intervenir de nombreux types cellulaires et tissus, ainsi que le microbiote intestinal. (2) Réduire : Le nombre d'animaux requis pour ce projet a été défini pour nous permettre d'atteindre nos objectifs scientifiques. Une stratégie de croisement optimale, ainsi que l'utilisation des individus des 2 sexes seront utilisés afin de réduire le nombre d'individus à produire. (3) L'élevage des animaux se fera dans un milieu enrichi (maisonnette, carrés de cellulose) sous la supervision de personnels qualifiés des animaleries, et selon le suivi strict de l'évaluation de l'état des animaux (grilles d'évaluations et points limites).

Nous déclarons utiliser 1 lignée transgénique possédant cette mutation, soit un total d'animaux d'intérêt à générer estimé à 580 individus, sur une durée totale de projet de 5 années. Les animaux produits seront utilisés dans des expériences visant à étudier comment les changements de la flore intestinale peuvent impacter le développement des tumeurs du système digestif, comprendre l'implication de certaines populations de cellules immunitaires dans la susceptibilité à ces mêmes cancers, et enfin trouver des substances d'intérêt capable d'inhiber la progression tumorale.

**20179** Dans son rapport présenté en février 2017, l'Organisation Mondiale de la Santé lance l'alerte sur le nombre insuffisant de nouveaux antibiotiques en développement et la menace croissante de la résistance aux antimicrobiens. Elle publie également sa première liste « d'agents pathogènes prioritaires », hautement résistants aux antibiotiques, énumérant les familles de bactéries les plus menaçantes pour la santé humaine. En tête de liste de la catégorie « critique » se trouvent les bactéries du genre *Acinetobacter* spp, et en particulier l'espèce *Acinetobacter baumannii*. C'est un pathogène fréquemment associé aux infections nosocomiales (acquises en milieu hospitalier), telles que les septicémies et les pneumonies sévères acquises sous ventilation chez les patients de réanimation ou immunodéprimés. *Acinetobacter baumannii* est le plus souvent résistant à un grand nombre d'antibiotiques, y compris les carbapénèmes, qui constituent l'une des dernières lignes de traitement actuellement disponible (51% de résistance aux carbapénèmes en 2010 et jusqu'à 80% de résistance dans certains pays européens). De ce fait, les infections à *Acinetobacter baumannii* sont grevées d'une mortalité hautement significative, à hauteur de 40%. C'est dans cette optique qu'une équipe de recherche a développé une classe de composés présentant une activité antibactérienne spécifique de la bactérie d'*Acinetobacter baumannii*.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'efficacité de trois de ces composés à action antimicrobienne chez la souris dans deux modèles d'infection (septicémie et pneumonie) à *A. baumannii*. Cette étude fait suite à un projet déjà accepté où la toxicité et la pharmacocinétique de ces trois composés ont été étudiées.

La première partie de ce projet consistera à évaluer l'efficacité de ces composés dans un modèle d'infection aigüe (sepsis) à *A. baumannii*. Différentes fréquences d'administration de ces composés seront évaluées en comparaison avec un antibiotique de référence, le méropénème.

Dans la deuxième partie, seuls les deux composés ayant montré une meilleure efficacité lors de la phase 1 seront évalués dans un modèle de pneumonie à *A. baumannii* chez la souris.

Pour ce projet, 152 souris C57Bl6 femelles seront nécessaires.

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 sera réduit au maximum grâce à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité de ces composés sur certaines souches d'*Acinetobacter baumannii*. 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 (toutes les 4h) sera également réalisée tout au long de l'étude afin de pouvoir anticiper au maximum les signes de souffrance. De plus, 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 (raffinement).

**20180** La cicatrisation des plaies représente une propriété cruciale pour la survie d'un organisme. La reconstitution tissulaire est une réponse physiologique complexe déclenchée par une blessure. Les réponses de cicatrisation sont également activées au cours de diverses situations pathologiques en l'absence d'agression externe blessante, dont la fibrose tissulaire.

Les contraintes mécaniques sont des régulateurs importants de la migration cellulaire dans le processus de cicatrisation. Certaines protéines membranaires (localisées à la surface cellulaire) comme les canaux ioniques mécano-sensibles sont activés par ces contraintes mécaniques et sont

associés à plusieurs processus biologiques qui affectent directement la migration cellulaire et la cicatrisation des plaies. Ces canaux ioniques forment un pore dont l'ouverture dépend de la tension mécanique dans la membrane. Ils assurent ainsi la transduction directe d'une stimulation mécanique en flux ionique, activant des voies de signalisation cellulaires permettant de répondre rapidement à ces contraintes mécaniques. Les canaux cationiques non sélectifs hyperpolarisants K<sup>+</sup> et dépolarisants sont présents au niveau de la membrane plasmique des cellules de mammifère. Nous avons dans un premier temps démontré *in vitro* un rôle de ces deux familles de canaux dans la cicatrisation cellulaire. Afin d'explorer leur rôle *in vivo* nous allons réaliser une étude comparative de la cicatrisation de la muqueuse buccale des souris contrôles, invalidées pour les canaux dépolarisants dans les fibroblastes et invalidées pour les canaux hyperpolarisants, après induction d'une lésion de la gencive.

Pour mener à bien ce projet, il sera nécessaire de recourir à 160 souris.

Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R :

-Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé les mécanismes *in vitro* qui sous-tendent notre hypothèse. Nous avons besoin de les valider dans un organisme entier tel que la souris car pour le moment, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier. L'utilisation du modèle primate est très compliquée tant d'un point de vue éthique, financier et pratique. De par ses similarités avec la physiologie, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique.

- Réduire : nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir des résultats statistiques exploitables, robustes et valables (logiciel G\*Power)

- Raffinement : Le raffinement de notre projet s'effectue à partir de la naissance des souris et tout au long des procédures. Cela débute par la reproduction et le maintien des animaux dans une animalerie conventionnelle et agréée avec le personnel formé et habilité et le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux. Des dispositifs d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés de ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Durant la phase expérimentale, le personnel technique habilité et formé, veillera à l'application de procédures visant à minimiser toute souffrance ou stress (notamment anesthésie/analgésie), réalisera les tests et notera toutes remarques pertinentes durant ou après la réalisation des tests expérimentaux sur des fiches de suivis (annexe1). Ces fiches incluent des grilles de scores avec des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les souris de l'étude lorsqu'un des points limites sera atteint et en cas de nécessité nous pratiquerons une euthanasie d'urgence.

**20181** Face à la demande croissante des consommateurs en produits de la mer, l'aquaculture est un secteur en pleine expansion au niveau mondial. En France, la pisciculture marine se distingue par le savoir-faire de ses éclosiers, qui exportent à l'international. Cette filière est confrontée à des épisodes infectieux dus à des agents pathogènes qui impactent les élevages de bars européens (ou bar commun ; *Dicentrarchus labrax*) et de daurades royales (*Sparus aurata*). Les mortalités et morbidités induites ont un impact sur le bien-être animal et la productivité. Pour répondre à ces menaces, contribuer à la réduction de l'usage d'antibiotiques en nutrition animale et valoriser les ressources naturelles, le développement et l'utilisation de probiotiques, complément microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte, représentent une solution innovante et durable.

Des souches bactériennes de *Pseudoalteromonas* isolées de l'environnement marin ont démontré *in vitro* des propriétés intéressantes d'inhibition de la croissance de plusieurs bactéries pathogènes d'animaux aquatiques. Des expérimentations menées sur crevettes ont confirmé la capacité de ces souches à rendre les animaux plus résistants à des épisodes infectieux mais également à améliorer leurs performances de croissance et à limiter la formation de biofilms bactériens dans les installations d'élevage. Après une première phase expérimentale qui a consisté à vérifier l'innocuité de ces souches bactériennes seules ou en mélange et leur capacité à imprégner des poissons



marins, l'objectif de ce projet est de caractériser leurs potentiels effets positifs en évaluant l'impact de cette imprégnation sur l'amélioration de la capacité des poissons à résister à une infection bactérienne ou virale. Des bars et des daurades seront mis en contact régulier pendant 4 à 8 semaines avec les souches probiotiques (seules ou en mélange) en intégrant des analyses régulières de plusieurs paramètres (croissance, immunité, ...). Ils seront ensuite soumis à des épreuves infectieuses pour déterminer si l'imprégnation avec les probiotiques a un effet sur la résistance à des pathogènes. Un total de 4020 poissons juvéniles (bars et daurades) seront utilisés. 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 en circuit ouvert 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. La nécessité de reproduire *in vivo* le potentiel effet protecteur de ces souches, déjà identifiées chez les crevettes, sur deux espèces marines majeures de poissons ne permet pas de remplacer l'utilisation d'animaux.

**20182** Le développement des gonades (ovaires et testicules) durant la vie embryonnaire est un processus étroitement contrôlé. Il fait intervenir plusieurs gènes, dont l'un d'eux fait l'objet d'études dans notre laboratoire. Des travaux ont montré que ce gène auquel nous nous intéressons, nommé SF-1, est à l'origine de troubles du développement sexuel (DSD) lorsqu'il n'est pas présent en quantité suffisante, ou qu'il est présent en trop grande quantité. Chez l'humain, la prévalence des DSD est estimée à 1/4500 naissances, et regroupe des troubles divers allant de la réversion du sexe à l'infertilité masculine ou l'insuffisance ovarienne à des degrés variables. Il apparaît donc que non seulement la présence de SF-1 est essentielle, mais que les niveaux auxquels il est présent sont tout aussi importants pour le développement du sexe et le maintien de la fonction de reproduction. L'objectif de ce projet est donc de déterminer les effets d'une dérégulation de SF-1 sur différents paramètres de la fonction de reproduction, incluant le développement du sexe, la fertilité et la fécondité.

Afin de répondre à cet objectif, nous générerons un modèle unique de souris surexprimant le gène SF-1 dans les tissus où il est normalement exprimé depuis la vie embryonnaire. Les différentes analyses que nous prévoyons d'effectuer dans ce projet requièrent un maximum de 1008 animaux, utilisés au mieux selon la règle des 3R.

\* Remplacement : À ce stade, le recours au modèle animal est nécessaire afin de vérifier les précédentes observations faites *in vitro* et de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques.

\* Réduction : Le nombre d'animaux indiqué permettra d'obtenir des résultats statistiquement robustes et, un maximum d'analyses sera effectué sur le même animal (analyses biochimiques, histologiques, de biologie moléculaire...)

\* Raffinement : Nous avons choisi une approche où la surexpression du gène SF-1 aura lieu uniquement dans certains tissus afin de limiter les caractères dommageables. De plus, l'hébergement se fera selon les conditions habituelles (maximum de 6 animaux par cage) et les souris disposeront de l'enrichissement nécessaire (abris, litière, bâtonnets de bois, ouate). Aussi, nous serons vigilants quant à la détresse, aux signes de douleurs, ou tout comportement anormal des souris. Advenant que les animaux présentent ces signes, ils seront pris en charge selon la procédure en vigueur afin d'éviter toute souffrance : selon l'état de l'animal, il s'agira de soins adaptés ou alors d'un sacrifice.

Grâce à cette approche intégrative, nous pourrions étudier les effets du dosage de SF-1 sur la mise en place, le développement et la fonction des gonades. De plus, les résultats obtenus ici permettront de manière translationnelle de proposer des hypothèses quant à la survenue des DSD chez l'humain.

**20183** L'entérite nécrotique à *Clostridium perfringens* est une maladie préoccupante et très présente dans les élevages aviaires. C'est l'affection la plus sévère décrite parmi les entérites dues à des clostridies. *C. perfringens* étant une bactérie normalement présente dans l'environnement (sol, poussière, fientes et litière) 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. Bien que les facteurs déclencheurs conduisant à l'implantation de la bactérie et à la génération de lésions soient encore mal connus, un modèle expérimental d'entérite nécrotique à *C. perfringens* a été récemment mis au point par notre laboratoire avec le recours à une infection préalable avec des coccidies (*Eimeria maxima*).

L'objectif de ce projet est de tester des produits qui pourraient remplacer les antibiotiques utilisés pour traiter cette maladie tels que des additifs de l'alimentation animale, des compléments alimentaires ou encore des vaccins censés prévenir la survenue des symptômes d'entérite nécrotique en utilisant le modèle expérimental validé. Des essais seront conduits sur une durée de cinq ans, à raison de 3 essais par an avec pour chaque essai, six lots de 40 poules domestiques au maximum, soit un total de 240 sujets par essai, soit 720 sujets par an et 3600 sur 5 ans.

Du fait de la double infection, coccidienne et clostridienne, il est nécessaire d'avoir deux groupes témoins négatifs (non infecté et non traité) et positifs (infecté et non traité) ainsi que des groupes témoins positifs uniquement inoculés par des coccidies et traités afin de pouvoir distinguer l'effet spécifique des produits à tester sur chaque type d'infection.

Les animaux seront reçus en animalerie à 1 jour d'âge puis seront élevés jusqu'à 10 jours. Le 10<sup>ème</sup> jour, les animaux des deux groupes test et des trois groupes témoins positifs recevront une dose déterminée d'un inoculum d'*E. maxima*. Le 14<sup>ème</sup> et 15<sup>ème</sup> jours les animaux des deux groupes test et du groupe témoin positif de double inoculation recevront chacun une dose déterminée d'un inoculum de *C. perfringens*.

Les animaux des deux groupes tests et des groupes témoins positifs uniquement inoculés par des coccidies recevront le produit à tester selon le mode d'administration recommandé (aliment, eau de boisson...). Pour évaluer l'efficacité de chaque produit, des examens cliniques seront réalisés biquotidiennement pendant 6 jours sur les animaux et des examens lésionnels effectués 6 jours après les premières inoculations ainsi que sur les animaux morts en cours d'essai. Les performances techniques pourront être évaluées grâce à des pesées lors des inoculations et des examens lésionnels.

Ce protocole est établi dans le respect des 3R. Il n'existe actuellement pas de modèle sans passer par les animaux cibles de cette affection, à savoir les poules domestiques. L'effectif utilisé est minimal pour permettre une analyse des paramètres enregistrés et permettre d'observer des différences statistiques entre les groupes.

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, cordelettes suspendues, rampes d'abreuvement par pipettes qui servent également de perchoirs, éclairage naturel complété par un éclairage artificiel en jours courts, qui permet de respecter le rythme circadien des oiseaux. Une surveillance renforcée après inoculation bactérienne sera mise en œuvre pour pouvoir détecter rapidement toute atteinte du point limite et ainsi réduire la douleur en procédant à une mise à mort compassionnelle.

**20184** La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule malade une copie normale d'un gène afin de corriger/ralentir la progression d'une maladie héréditaire ou acquise. Les vecteurs recombinants dérivés des Virus Adénos-Associés (AAV) sont des vecteurs de choix car ils assurent un transfert de gène thérapeutique sûr et efficace dans différents tissus. Il existe différents sérotypes, certains ayant la propriété de cibler un organe ou type cellulaire en particulier.

Ce projet s'intéresse au transfert de gène dans la rétine. L'œil a pour fonction de recevoir la lumière et de transformer l'énergie lumineuse des photons en influx nerveux (phénomène de phototransduction), transmis ensuite au cortex visuel et interprété en images. La phototransduction

se déroule dans les photorécepteurs rétiniens : bâtonnets et cônes. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien (RPE) sont indispensables à la fonction et à la survie des photorécepteurs. La maladie de Stargardt (STGD1) est une dégénérescence rétinienne avec une prévalence de 1 pour 8000/10000 personnes. Dans STGD1, la macula région riche en cônes, est principalement affectée. Les cônes sont nécessaires pour la vision diurne et c'est la perte de ce type cellulaire qui entraîne la cécité. Il n'existe pas de traitement clinique pour cette cécité qui impacte les hommes et femmes entre 15 et 40 ans.

Le but de notre stratégie thérapeutique est de livrer le gène *Abca4* à l'aide de vecteurs recombinants rAAV et plus particulièrement de l'AAV2/8. Comme cette maladie est de type autosomique récessif, cette stratégie semble la plus logique, mais se heurte au fait que le gène *Abca4* est de trop grande taille pour pouvoir être introduit dans les vecteurs rAAV disponibles. La stratégie « dual-vector AAV » consiste à délivrer deux AAVs, l'un porteur de la première moitié (partie 5') et l'autre de la seconde moitié (partie 3') du gène *ABCA4*. Les deux parties de la protéine sont codées par les deux vecteurs AAV avec des adaptateurs, nommés « intéines ». Ils ont été testés *in vitro* et sur un modèle souris KO de la maladie de SGD1 et sont efficaces.

Ce projet est une étude préclinique sur modèle non rongeur, afin de pouvoir par la suite passer en phase clinique.

Phase 1 : Étude de toxicité de la thérapie par injection d'AAV avec intéines dans le modèle macaque.

Des vecteurs AAV2/8 à base d'*Abca4*-intéine seront injectés chez les animaux soit en injection unilatérale (un seul œil) soit en injection bilatérale (deux yeux), validées lors des injections sur les modèles rongeurs.

Un maximum de 4 macaques sera utilisé pour cette étude

Ces macaques seront injectés avec les vecteurs par voie sous rétinienne, soit en injection unilatérale (l'œil contrôle recevra le véhicule) soit en injection bilatérale et ils seront suivis pendant 6 mois.

L'effet thérapeutique sera évalué par réalisation de fonds d'œil associés, d'examens de tomographie à cohérence optique (OCT) mesurant l'épaisseur de la rétine et par électrorétinographie (ERG), test qui évalue indirectement la fonction de la rétine en mesurant la différence de potentiel à travers la surface de la cornée.

Ces imageries seront réalisées en baseline puis toutes les semaines le premier mois, puis une fois par mois jusqu'à l'euthanasie. Tout au long de l'étude, aux mêmes timepoints que les imageries, des prélèvements sanguins seront effectués afin de d'évaluer une éventuelle réponse immunitaire dirigée contre le vecteur. Après 6 mois, les animaux seront euthanasiés et des analyses de quantification du génome viral et de l'expression de *ABCA4* seront réalisées afin de déterminer la transduction des cellules de la rétine pigmentaire (RPE) par le vecteur.

Application de la règle des 3R :

1) Réduction :

La détermination du nombre d'animaux a été réalisée par approche statistique et sur la base de l'expérience d'études similaires en thérapie génique des maladies de la vision. La constitution des groupes permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans être excessif.

Ce nombre d'animaux permettra une analyse statistique des résultats (ANOVA) afin de conclure éventuellement à l'efficacité du vecteur étudié.

2) Raffinement :

Des études antérieures de notre équipe ont été faites sur des modèles rongeurs afin de valider l'efficacité de ce vecteur. Toutes les interventions sur animaux se feront sous anesthésie générale et locale renforcée si nécessaire par des compléments analgésiques et anti-inflammatoires appropriés, pour réduire la contrainte imposée aux animaux. L'état de santé des animaux est surveillé tout au long des expériences afin d'éviter l'apparition éventuelle d'une souffrance. Les

conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Pour leur bien-être, les animaux sont hébergés à plusieurs par cage (dans la limite réglementaire) dans un milieu enrichi comprenant de enrichissements alimentaires, physiques, sonores et visuels variés et l'enrichissement serait renforcé si un animal se retrouvait en hébergement seul. L'application de critères d'arrêts nous permettra d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance en utilisant des traitements antalgiques appropriés ou de décider d'une euthanasie.

### 3) Remplacement :

La rétine, structure complexe composée de multiples couches de neurones et cellules nourricières, ne peut être reconstituée parfaitement *in vitro*. L'utilisation de modèles animaux est donc indispensable pour étudier la pathophysiologie et le transfert de gènes dans la rétine. De plus, le primate est l'espèce qui présente la structure de l'œil la plus proche de celle de l'humain, ce qui en fait le modèle idéal pour la recherche translationnelle.

**20185** Si notre système immunitaire est capable de nous protéger contre les bactéries, champignons et virus, il est également capable de nous protéger contre le développement des tumeurs cancéreuses. Il a en effet été montré dès la fin des années

50 que certaines cellules immunitaires avaient la faculté d'éliminer directement les cellules tumorales. Toutefois, ces cellules peuvent dans certains cas être paralysées dans l'environnement de la tumeur et elles ne peuvent plus exercer leurs fonctions. Nous étudions comment maintenir, restaurer et amplifier les propriétés anticancéreuses d'un sous-type de lymphocytes, les lymphocytes T. Pour cela, nous utiliserons principalement deux approches thérapeutiques. La première consistera à renforcer les propriétés anticancéreuses des cellules T directement au sein de la tumeur. La seconde aura pour objectif d'isoler les cellules T, de les traiter dans des boîtes de culture *in vitro* afin de renforcer leurs propriétés anticancéreuses. L'état d'activation et l'activité anticancéreuse des lymphocytes T sont étroitement liées à l'environnement tumoral. Ainsi, pour que les résultats de nos études puissent être applicables à l'Homme, le recours à des modèles précliniques ne peut être évité. Nous allons donc réaliser notre étude dans deux modèles de cancers murins : un modèle de cancer de la peau et un modèle de cancer colorectal.

La mise en oeuvre du projet sera effectuée dans le contexte de la règle des 3R (réduction – remplacement – raffinement). Afin de réduire le nombre d'animaux de l'étude, les expériences ne seront répétées que deux fois. De multiples tests *in vitro* sont en outre prévus dans le projet, notamment en recherchant l'effet de différents composés sur les propriétés anticancéreuses des lymphocytes T. Cette stratégie permet d'identifier et de ne recourir au modèle animal que pour les composés les plus efficaces *in vitro*. Afin de réduire l'inconfort potentiel des animaux, certaines procédures expérimentales comme les injections sous-cutanées seront réalisées sous anesthésie. Les souris seront enfin maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu. Au total, 608 souris seront utilisées dans ce projet.

**20186** La dialyse péritonéale chez l'homme est le traitement le plus avantageux pour les patients dont la fonction rénale est trop dégradée. Le patient peut grâce à une machine, faire sa dialyse (nettoyage pour élimination/filtration des déchets du sang) à la maison. La dialyse péritonéale consiste à injecter un volume de liquide dans la cavité abdominale (appelée cavité péritonéale). Les composants de dégradation dans le sang n'étant pas présents dans ce liquide, un échange va se produire par filtration via la membrane du péritoine et ainsi le sang va se purifier de ses éléments toxiques au fur et à mesure que le liquide de dialyse injecté est remplacé. L'altération de la membrane péritonéale de la cavité abdominale par épaissement/établissement d'une fibrose bloque ce processus de filtration et est une des causes conduisant à une remise en cause de la dialyse péritonéale chez certains patients conduisant ce dernier à l'hémodialyse (passage du sang en circulation externe dans une machine pour le "nettoyer") nécessitant de se déplacer à l'hôpital 3

fois par semaine pour quelques heures, ou à la greffe de reins. L'activation du système immunitaire (globules blancs) est une des raisons conduisant à cet épaissement de la membrane péritonéale. Nous nous intéressons donc au rôle de 2 populations spécifiques de globules blancs: les mastocytes (MC) et les basophiles. Les mastocytes sont une des cellules prédominantes de la cavité péritonéale dans les conditions normales, ils pourraient donc avoir une influence dans le processus inflammatoire conduisant à cet épaissement. Les basophiles en conditions normales ne sont présents que dans le sang. Mais suite à une infection ou un signal de danger ou l'injection de liquide dialyse, ils peuvent être recrutés localement dans cette cavité. Les basophiles et les MCs sont connus pour répondre aux pathogènes bactériens. Comprendre les mécanismes cellulaires impliqués dans l'induction de cette fibrose conduisant à l'arrêt de la dialyse péritonéale est donc un enjeu majeur de santé publique qui permettra de pouvoir prolonger la dialyse péritonéale dans le temps et ainsi augmenter le bien être de vie du patient.

L'objectif de ce projet est donc d'étudier pendant les 4 ans de durée du projet si les mastocytes d'une part, et les basophiles d'autre part, sont impliqués dans le processus d'épaississement de la membrane filtrante en induisant l'accumulation et l'activation d'autres globules blancs et si un événement infectieux augmenterait leurs effets. Nous avons dans un précédent projet déterminé i) les doses de liquide de dialyse (2ml) à injecter quotidiennement (du lundi au vendredi) dans la cavité péritonéale (injection intrapéritonéale) afin de mimer le processus chez le patient, ii) la quantité de bactéries à injecter pour un épisode infectieux ainsi que iii) les temps d'analyse. Les animaux subiront donc une dialyse quotidienne (2ml de liquide de dialyse injecté en intrapéritonéale) pendant différents temps (2, 4 ou 8 semaines) afin de recréer les conditions observées chez le patient. Dans certaines procédures, nous ferons 1 ou 2 épisodes infectieux (Jour 7 pour le temps 2 et 4 semaines; jour 7 et 15 pour 2 épisodes infectieux aux temps 2 et 4 semaines; jour 15 et 21 pour 2 épisodes infectieux aux temps 4 et 8 semaines) afin de voir leur influence dans la fibrose et de mimer la réalité de la vie des patients.

Le prélèvement de membrane péritonéale chez le patient est impossible. De même, un prélèvement des cellules présentes dans la cavité péritonéale au cours du temps chez les patients n'est pas réalisable. Le modèle de dialyse sur souris nous permettra de mieux comprendre les processus physiologiques et de trouver un moyen d'éviter cette fibrose chez le patient afin d'augmenter son confort face à la maladie. De plus, la cavité péritonéale contient de nombreuses cellules du système immunitaire qui interagissent et s'influencent toutes entre elles. Un travail *in vivo* est donc indispensable pour comprendre le mécanisme dans son ensemble, comme l'influence des cellules recrutées localement suite à une réaction du corps. Nous travaillerons donc avec des souris *Mus musculus* transgéniques permettant d'étudier spécifiquement les mastocytes et les basophiles. Ces lignées de souris génétiquement modifiées sont déjà connues et leur phénotype est non dommageable. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 1110 animaux répartis de la façon suivante : 1) Mise en place de la cinétique et caractériser le rôle des mastocytes/basophile dans l'épaississement de la membrane lors de dialyse péritonéale chez la souris afin de mimer l'évolution physiologique observée chez les patients (combien de temps injecter du liquide de dialyse afin de mimer la dialyse quotidienne des patients). 2- Rôle des mastocytes dans la fibrose induite lors d'un modèle de dialyse péritonéale chez la souris (souris génétiquement modifiées qui auront ou pas la population mastocytaire ou basophile dans la cavité péritonéale afin de voir les conséquences et leur rôle) /interrelation avec les autres globules blancs. 3- Conséquences (accélération ou pas) d'événements infectieux sur cette fibrose péritonéale dans le modèle de dialyse péritonéale chez la souris (un ou 2 épisodes infectieux avec une bactérie tuée afin de mimer les épisodes infectieux sont souvent retrouvés chez les patients). Ceci n'est pas réalisable sur un patient et requiert l'utilisation du modèle animal. Ce projet est conforme aux règles des 3R. Remplacer : le recours à l'animal est indispensable car il n'existe pas de méthodes alternatives / substitutives de dialyse ou recréant la complexité de la réponse immunitaire globale. Les mécanismes d'interaction des mastocytes et autres cellules immunitaires seront étudiés *in vitro* à l'aide de modèle de culture cellulaire. Réduire : le nombre d'animaux limité au minimum requis pour la validité statistique (10 animaux par groupe, chaque expérience répétée 3 fois) avec les contrôles adéquates permettant d'apporter les conclusions scientifiques irréfutables (nombre de souris basé sur les publications *in*

*vivo*). Raffiner: Les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, poils hérissés, yeux fermés) seront les critères de points limites surveillés quotidiennement, à partir desquels la souris sera euthanasiée. En fin de procédure, les souris sont sacrifiées et les cellules de la cavité ainsi que la membrane péritonéale sont prélevées pour analyse.

**20187** L'intestin est un écosystème complexe et dynamique composé de plusieurs centaines d'espèces bactériennes, incluant des pathogènes potentiels, des bactéries commensales et des bactéries bénéfiques pour la santé de l'hôte. Aujourd'hui, le rôle prépondérant de l'écophysiologie du tube digestif sur la santé humaine est tout à fait reconnu. La microflore s'établissant très vite après la naissance est essentielle pour initier le système immunitaire et contribuer à l'homéostasie et aux fonctions de l'intestin. Bien qu'il y ait de plus en plus de rapports concernant les effets bénéfiques des probiotiques, leurs mécanismes d'action restent méconnus. Les probiotiques pourraient exercer leur efficacité protectrice par différents mécanismes

Le but de cette étude est de valider une formulation à base de probiotiques (microorganismes viables, dont une quantité suffisante atteint l'intestin à l'état actif et exerce des effets positifs sur la santé) sur la réponse immunitaire chez la souris.

35 animaux repartis en cinq groupes de 7 animaux seront constitués. Les souris seront gavées pendant 14 jours avec une solution saline ou de probiotique. L'effet du probiotiques sera ensuite étudié au cours du temps sur les différentes populations de cellules immunitaires circulantes (plasma) ou infiltrées dans certains organes tels que de l'intestin, du colon, du foie, de la rate et les ganglions lymphatiques mésentériques.

Cette étude prendra en compte la règle des 3 R:

Remplacement: il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution *in vitro* pour étudier l'impact de formules bactériennes et leurs conséquences sur la physiologie.

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 non-invasives. Les animaux seront hébergés par cage de 3 ou 4 et l'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et de matériel de nidification (bandelettes de papier kraft). Les animaux seront manipulés régulièrement pour les habituer à notre contact et ainsi limiter leur stress. Une anesthésie locale sera pratiquée lors des prélèvements sanguins.

**20188** La carence en vitamine D est considérée aujourd'hui comme un problème de santé publique majeur. En particulier, la population française dans sa globalité est fortement en déficience (Vernay et al. 2011). Des données préliminaires suggèrent un impact de la déficience en vitamine D sur la production de chaleur (thermogenèse). Ce projet est mis en place pour évaluer l'impact d'une carence prénatale en vitamine D sur la thermogenèse et la fonction du tissu adipeux brun. Le tissu adipeux brun ou graisse brune est considéré comme étant l'acteur essentiel de la production de chaleur et du maintien de la température corporelle. Au total ce protocole nécessitera 80 souris C57Bl6j. Les animaux seront hébergés en cage conventionnelle par groupe de 3 ou 4 individus et l'environnement sera enrichi par ajout d'igloo et de nid végétal. Ce projet impliquera l'étude de l'exposition des animaux au froid (4°C) afin de voir l'impact de la carence en vitamine D sur la résistance du tissu adipeux brun au froid. Une exposition au froid (4°C) pendant 7 jours consécutifs est prévue afin d'étudier l'impact d'une exposition plus longue au froid sur la fonction du tissu adipeux brun. La 3ème procédure consiste à mettre les souris à 30°C pendant 6 semaines, ce qui correspond à la température dite de thermoneutralité, l'objectif étant d'étudier l'impact de la carence en vitamine D sur la fonction du tissu adipeux brun en absence d'autres facteurs qui pourraient sur-activer le tissu adipeux brun.

Cette étude prend en compte la règle des 3 Rs:

Remplacement: il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle de substitution *in vitro* pour étudier l'impact d'une déficience en vitamine D sur la fonction du tissu adipeux. La souris est un modèle de choix car elle présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables 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. L'environnement sera enrichi par la présence d'un igloo en plastique et nid végétal. Des points limites et critères d'arrêt sont prévus dans le protocole.

**20189** Ce protocole d'étude vise à étudier le rôle d'une lectin-like de type C, CLEC-1, dans l'immuno-régulation de la réponse anti-tumorale. En effet, la recherche de nouvelles molécules impliquées dans les processus d'immuno-tolérance a identifié la molécule CLEC-1 comme présentant de fortes propriétés immuno-régulatrices : CLEC-1 réduit la capacité des cellules dendritiques à stimuler la réponse effectrice des lymphocytes T (LT) CD4+ notamment les Th17 et Th1. Ces résultats suggèrent que CLEC-1 agit comme récepteur inhibiteur dans les cellules dendritiques en inhibant la réponse T effectrice et la polarisation Th17 et Th1. Ainsi, bloquer CLEC-1 permettrait d'amplifier une réponse Th1 et Th17 et d'obtenir une meilleure réponse anti-tumorale. De façon concordante, nous avons pu montrer que l'absence de CLEC-1 dans un modèle orthotopique d'Hépatocarcinome (Hepa1.6), permet une augmentation de la survie des souris grâce à une réponse immune anti-tumorale accrue. De plus, nous avons 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 significative de la survie des souris.

Afin de poursuivre ces travaux et de mieux caractériser les indications en oncologie susceptibles de répondre à une immunothérapie anti-CLEC-1, nous souhaitons étudier la réponse immune anti-tumorale dans un panel plus large de modèles tumoraux (tumeurs solides et liquides) dans les souris CLEC-1 KO. De façon complémentaire, et afin de confirmer les résultats prometteurs obtenus dans les souris CLEC-1 KO, nous avons développé des souris huCLEC-1 KI, qui expriment le domaine extra-cellulaire de la protéine CLEC-1 humaine à la place de la protéine CLEC-1 murine. Enfin, nous avons synthétisé des anticorps monoclonaux humanisés antagonistes de la protéine humaine CLEC-1. Grâce à ces nouveaux outils, nous souhaitons étudier l'effet du blocage de CLEC-1 dans la réponse antitumorale, en ayant comme objectif 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 afin de tester l'implication de cette molécule. Il est également nécessaire d'avoir accès aux organes lymphoïdes secondaires et à la tumeur pour étudier les mécanismes liés au blocage de CLEC-1 dans la réponse antitumorale.

Pour ce projet de 5 ans, le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 990 souris, selon une étape #1 d'identification de modèles tumoraux sensibles à l'absence de CLEC-1 dans des souris CLEC-1 KO, une étape #2 d'optimisation uniquement dans les modèles tumoraux sensibles avec des anticorps monoclonaux anti-CLEC-1 destinés à être étudiés ultérieurement en clinique, et une étape 3 où nous combinerons notre meilleure immunothérapie antagoniste de CLEC1 humain avec d'autres immunothérapies ou chimiothérapies d'intérêt, afin de combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique.

Le projet a été pensé pour répondre à des besoins scientifiques tout en adoptant un comportement responsable en matière d'expérimentation animale (Règle des 3R). Le nombre d'animaux est réduit par une mutualisation des groupes contrôles lorsque c'est possible, et il est limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement fiables. Le paragraphe ci-dessus présente une estimation haute qui sera potentiellement réduit en fonction effets thérapeutiques obtenus. Pour le « Remplacement », les traitements à évaluer ont déjà démontré des résultats prometteurs *in vitro* sur de nombreux tests comme des évaluations à partir de PBMC humain frais ou de tumeurs isolées de patient. Les modèles tumoraux chez la souris CLEC-1 KO et huCLEC1-KI nous permettent de valider l'effet thérapeutique de nos traitements à l'échelle d'un organisme ainsi que d'évaluer leur

potentiel effet toxique avant d'envisager un essai clinique. Pour le « raffinement » et le bien-être des animaux, une étape d'acclimatation de 5 jours minimum sera respectée avant inclusion dans des protocoles expérimentaux. 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. Nous avons aussi mis en place une procédure non invasive pour visualiser par imagerie de bioluminescence la croissance de la tumeur. Cette technique nous permet d'exploiter au mieux les résultats et ce, sans souffrance pour l'animal. 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. Comme décrit dans les paragraphes des procédures expérimentales ci-dessous, des analgésiques seront utilisés avant et après chirurgie. Enfin des points limites ont été mis en place afin de réagir rapidement en cas d'inefficacité des traitements ou de souffrance animale.

**20190** La valeur nutritionnelle des matières premières pour l'alimentation des volailles a fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, l'évolution du contexte de production (compétition entre alimentation animale et humaine, demande mondiale en protéine, réduction des gaspillages alimentaires, progrès génétique et technologique, réglementation) va modifier l'utilisation des aliments pour volailles. Il est donc nécessaire d'évaluer au fil de l'eau la valeur des aliments pour les volailles.

La méthode d'évaluation de la valeur nutritionnelle *in vivo* des aliments et des matières premières pour les volailles, publiée en 1990, et utilisant le modèle coq adulte, sert de référence en Europe et dans le monde. Cette méthode, appelée méthode des bilans individuels, a permis la construction de tables d'alimentation pour les filières animales, et reste la méthode de référence *in vivo* : les conditions d'hébergement et la procédure ont été définis en commun par les cinq structures de recherche dans le domaine en France, afin de travailler en réseau et de pouvoir échanger des données.

Un « bilan » consiste à quantifier le pourcentage de chaque nutriment réellement disponible pour le maintien, la croissance ou la production de l'animal ou à l'inverse, excrété dans l'environnement. Il s'agit pour cela, de collecter toutes les fientes des coqs, individuellement et quotidiennement pendant 3 jours, puis à les lyophiliser et les broyer avant de les analyser pour mesurer la digestibilité de l'aliment testé et distribué à volonté aux animaux.

L'objectif de ce projet est de fournir aux opérateurs nutritionnistes volailles des références *in vivo* sur les ingrédients utilisés en France et à l'étranger.

Au total, 300 coqs mâles adultes seront utilisés, soit une bande de 60 animaux renouvelée chaque année.

Prise en compte des 3R :

- Remplacement : les particularités anatomiques et digestives des oiseaux ne permettent pas de les remplacer par un autre modèle animal. Par ailleurs il n'existe à ce jour aucune méthode *in vitro* permettant de simuler la réponse de l'animal.

- Réduction : cette méthode permet de travailler avec 8 animaux par traitement, et, s'agissant d'animaux adultes, de réaliser plusieurs bilans successifs sur le même animal, préalablement accoutumé à la cage. Statistiquement, ce nombre d'animaux nous permet d'obtenir des différences ayant un sens biologique (1 à 3% d'écart sur la digestibilité) entre les traitements. Nous réaliserons une analyse de variance sur les résultats individuels, avec comparaison de moyennes. Aussi, le développement d'outils d'analyse performants (type SPIR - Spectrométrie Proche Infrarouge) permet de réduire le recours à l'animal, mais nécessite une calibration préalable.

- Raffinement : les animaux sont adaptés aux cages et entraînés à des manipulations, ce qui permet de réduire les stress. Ils reçoivent une alimentation variée. D'autre part, les cages sont aménagées pour concilier le bien être des animaux et les contraintes de la procédure (perchoirs, jouets) et elles sont disposées de manière à procurer aux coqs une perception visuelle, auditive et olfactive entre congénères. Des points limites sont déterminés et durant la phase d'élevage, une grille d'évaluation



du bien-être des poulets sera complétée quotidiennement par le personnel animalier et permettra de détecter précocement toute altération de leur état de santé ou de leur comportement.

**20191** L'aliment des poules pondeuses est conçu pour apporter les nutriments nécessaires aux besoins d'entretien et de production. Il se définit par un mélange de matières premières, additifs, et minéraux.

L'objectif de ce projet est d'évaluer la composition corporelle et les performances de ponte des poules pondeuses au cours des premières semaines suivant leur transfert du bâtiment d'élevage au bâtiment de ponte. Ce suivi est fait afin d'ajuster au mieux les apports nutritionnels à leurs besoins et d'évaluer l'arrière-effet de l'alimentation reçue sur leur première période de vie sur les performances de ponte: de leur éclosion au début de la ponte (période d'élevage). Pour cela les poules peuvent être conduites avec une alimentation à volonté ou une alimentation rationnée à un niveau permettant de couvrir les besoins nutritionnels.

L'évaluation de la composition corporelle des animaux (BIA) passe par la mesure de la bio-impédance, qui repose sur les propriétés électriques des tissus. Elle se fait à l'aide d'électrodes mises en contact de l'épiderme au niveau des cuisses. A partir des données obtenues et d'équations de prédiction préalablement établies, il est possible d'estimer les quantités en eau, en matière grasse et en matière maigre des poules. Ces données sont des indicateurs de la façon dont les poules utilisent leurs réserves corporelles et l'aliment consommé, ce qui permettra d'adapter les apports nutritionnels.

**REMPACEMENT** : La complexité des paramètres influant sur les besoins nutritionnels et leurs interactions ne permet pas d'une part d'utiliser uniquement des modèles alternatifs (modélisation, méthodes *in vitro*). D'autre part, la réponse à un régime alimentaire (digestion, absorption, utilisation...) est spécifique à chaque espèce. Les données de ce projet étant destinées à la filière avicole, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur des poules pondeuses.

**REDUCTION** : L'ensemble des 864 poules arrivées simultanément dans le bâtiment constitue une bande. Elles sont réparties en 9 groupes, également appelés traitements. Chaque groupe a reçu un aliment différent durant la période d'élevage avant l'entrée en bâtiment de ponte. Il y a 6 cages de 16 poules par traitement. Les mesures de BIA sont réalisées en début et vers la fin de la période d'essai. Il y a un essai par bande. L'objectif est d'obtenir, pour chaque traitement, 20 données individuelles d'évolution de bio-impédance. 4 cages, choisies au début de l'essai comme étant les plus homogènes en poids, font l'objet des mesures de BIA, soit 64 poules par programme alimentaire. Cela fait  $64 \times 9 = 576$  poules sollicitées pour la mesure en début d'essai. Vers la fin d'essai, la mesure est réalisée successivement sur l'ensemble des 64 poules d'un programme alimentaire, jusqu'à atteindre le nombre de 20 mesures exploitables. Les 20 données d'évolution de bio-impédance par traitement sont le nombre nécessaire et suffisant pour permettre une analyse statistique des données visant à mettre en évidence des différences de composition corporelle avec les aliments consommés.

Sur la durée du projet, 2 bandes de poules sont impliquées, soit 1728 poules au total.

**RAFFINEMENT** : Les poules sont logées dans des cages collectives, dans le respect de la réglementation élevage. Ainsi, les animaux sont élevés dans des conditions proches de celles rencontrées sur le terrain tout en permettant d'étudier précisément l'effet des aliments et matières premières. Les cages sont équipées d'un nid, de perchoirs d'une litière permettant le picotage et le grattage et d'un dispositif de raccourcissement des griffes, dispositif conforme aux normes d'élevage.

Le maintien de 16 poules pondeuses par cage permet de se rapprocher le plus possible des densités d'élevage tout en ayant des différences statistiquement significatives. Les essais en poule pondeuse ont pour but d'évaluer les besoins de la souche tout en prenant en considération la gestion du groupe. 16 poules par unité expérimentale (=cage) permettent de répondre à ce besoin. L'état de santé des animaux sera vérifié quotidiennement par les techniciens animaliers de l'établissement utilisateur. Si une poule présente des signes de douleur comme des difficultés à se

déplacer, elle sera écartée de l'étude. Des points limites (prostration, problèmes locomoteurs, dégradation de l'emplumement) seront appliqués tout au long du projet. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance ou un stress (contention pour les mesures de bio-impédance), le nombre d'animaux sera réduit au minimum permettant la démonstration statistique d'un effet du traitement.

Une poule pourra faire l'objet de 4 mesures de BIA au maximum.

Les poules sollicitées pour les mesures expérimentales sont gardées dans la filière de consommation. Ainsi tous les animaux inclus dans ce projet resteront dans la filière de consommation.

**20192** Contexte scientifique : Les mammifères ont optimisé des moyens sensoriels de pilotage de leurs nouveau-nés vers la source nourricière, le lait. Ces moyens sensoriels reposent essentiellement sur l'aptitude des nouveau-nés à détecter des signaux olfactifs émis dans la zone mammaire et plus particulièrement dans le lait. Les travaux antérieurs réalisés dans notre équipe, chez différentes espèces de mammifères, humains ou non humains, ont permis de mettre en évidence l'aptitude des nouveau-nés à réaliser, en présence de l'odeur du lait de leur espèce, une chaîne comportementale aboutissant à la tétée (recherche de la tétine, mise en bouche, succion). Chez la souris, nous avons également pu mettre en évidence la capacité des nouveau-nés à exprimer une attraction plus ou moins intenses envers l'odeur de laits ayant différentes caractéristiques génétiques (provenant de différentes souches de souris) ou physiologiques (provenant de femelles à différentes périodes de lactation). Ce projet, soutenu par l'ANR MILKODOR, a donc pour objectif d'identifier chez la souris le ou les composés olfactifs volatils (COV) présents dans le lait i) qui permettent d'expliquer ces réponses différentielles du souriceau et surtout ii) qui participent activement à l'initialisation de la tétée.

D'un point de vue méthodologique, ce projet est composé de trois étapes donc les 2 1ères ont déjà été réalisées. Dans un premier temps le projet a consisté à réaliser des traites de souris femelles allaitantes i) à différents moments de la lactation et ii) soumis à différents régimes alimentaires. Puis, dans un deuxième temps, avec l'aide de collègues chimistes et chimométriciens, l'analyse chimique de la fraction volatile de ces laits a permis d'identifier une liste de molécules potentiellement impliquées dans l'attractivité du lait. Enfin, dans un troisième temps, il s'agira maintenant de proposer ces composés olfactifs volatils (COV) à des souriceaux, aux cours de 2 tests comportementaux en lien avec le contexte de tétée, afin de déterminer le ou lesquels participent activement au déclenchement des comportements de recherche et de saisie de la tétine : 1260 souris et souriceaux, au maximum, participeront sur 3 ans à la dernière étape de ce projet.

La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, la "Réduction" puisque le nombre de souriceaux testés dans chaque groupe expérimental sera optimisé en fonction des tests statistiques choisis. D'autre part la procédure expérimentale n'étant ni douloureuse, ni invalidante, les animaux pourront être conservés pour les besoins de l'élevage ou pour participer à un autre projet. Concernant le "Raffinement", la procédure de collecte des laits et les tests comportementaux sont pensés dans le but de réduire au maximum le stress des animaux (sous anesthésie pour les traites, environnement thermo-régulé pour collecte et tests comportementaux). Enfin, ce projet étudiant les mécanismes impliqués dans la communication précoce entre la mère et le nouveau-né chez les mammifères, la règle de "Remplacement" n'est ici pas envisageable.

**20193** Une évolution importante pour promouvoir une aquaculture plus durable réside dans le développement des élevages en circuits fermés qui offrent un meilleur contrôle des paramètres environnementaux, optimisent l'utilisation de l'espace et de l'eau et minimisent les rejets. Dans de tels systèmes, l'apport d'eau neuve est faible, ce qui minimise le rejet d'effluents. L'aquaponie, qui est l'intégration de la culture de plantes hydroponiques à la pisciculture, utilise ces effluents riches en nutriments pour cultiver une variété de fruits, légumes, herbes aromatiques et plantes ornementales. Le sandre est un poisson d'eau douce très apprécié des consommateurs. C'est une

espèce aquacole prometteuse en Europe. Il est cependant très sensible aux facteurs de stress environnementaux et aux manipulations en aquaculture. Cela limite le développement de son élevage en circuits fermés, qui restent cependant le mode de production le plus pertinent pour la culture de cette espèce. Au cours des dernières décennies, une attention croissante a été accordée aux plantes, appliquées comme additifs alimentaires ou en balnéation, en tant qu'immunostimulants et alternatives à la chimiothérapie conventionnelle. Elles réduisent le stress et améliorent la croissance et l'immunité des poissons en raison de leur teneur en composés phytochimiques (polyphénols, alcaloïdes ou polysaccharides). A ce jour seuls quelques traitements à base de plantes ont été testés sur le sandre et aucune molécule spécifique ayant un effet positif n'a été identifiée. La polyculture de différentes espèces de poissons est une autre approche pour améliorer la production du sandre. La tanche est une espèce pertinente pour cet objectif. Communément appelée « poisson docteur », cette espèce secrète un mucus qui présenterait des propriétés curatives, des observations de praticiens de l'aquaculture suggèrent son effet calmant sur d'autres espèces de poissons. Toutefois les bases scientifiques de cet effet positif n'ont pas été déterminées. La polyculture du sandre avec la tanche est donc une approche possible pour améliorer le bien-être des sandres. L'expérience proposée vise à tester si la croissance et le bien-être du sandre peuvent être améliorés grâce à l'apport de biomolécules végétales dans l'aliment ou la polyculture avec la tanche. Cette expérience fait suite à des tests préliminaires menés *in vitro* concernant l'effet de molécules végétales sur des paramètres classiques de l'immunité mesurés dans le rein antérieur et les branchies du sandre, et qui REDUISENT le nombre d'animaux nécessaires à une expérience. Cependant, les expériences *in vitro* ne peuvent jamais reproduire complètement les conditions *in vivo* et REMPLACER les expériences d'alimentation menées à plus long terme dans des conditions d'aquaculture réalistes. Dans une expérience de quatre mois, l'effet de deux phytomolécules ajoutées à l'aliment pour poisson, ainsi que la polyculture avec la tanche, seront déterminés à partir d'indicateurs de performance du sandre en circuit fermé : croissance, niveau de stress et immunité. La biomasse, un indicateur de performance important en aquaculture, peut être déterminée par des méthodes non invasives et sera évaluée plus fréquemment et sur un plus grand nombre de poissons. Des prélèvements de sang (unique procédure expérimentale de ce travail) seront réalisés sur un échantillon de la population de sandres. Les sandres seront élevés en monoculture, sans ajout de phytomolécules (modalité témoin) ou avec l'ajout de deux phytomolécules différentes (une modalité expérimentale par phytomolécule en monoculture). Les sandres seront aussi élevés en polyculture (sandre et tanche, sans ajout de phytomolécule). La combinaison des traitements de deux expériences différentes (phytomolécules, tanche) permet de comparer ces modalités avec le même traitement témoin et de REDUIRE ainsi le nombre de poissons utilisés. L'expérience sera menée dans des systèmes en circuit fermé (chaque traitement est conduit en triplicat) dans des conditions proches de la production commerciale. Le nombre de poissons mobilisés pour la réalisation de ce travail est : 2670 sandres et 60 tanches. TOTAL : 2730 poissons, 2 espèces. Le projet sera conduit avec le souci permanent de respecter les exigences physiologiques et comportementales de l'ensemble des espèces de poissons, avec l'application de points limites dans un objectif de RAFFINER le parcours expérimental et tous les actes portés sur les poissons.

**20194** Le postulat de la sélection génétique animale suppose que les différences génétiques entre les individus sont dues à des différences de séquence d'ADN héritées des parents. Les variations observées dans les caractères de production, de reproduction, de santé ou de longévité de carrière sont donc en partie dues à ce déterminisme génétique mais aussi à des effets de l'environnement et l'interaction qui existe entre les deux. Les connaissances récentes sur les effets de l'environnement pointent sur des effets dits « épigénétiques ». En effet, des modifications biochimiques de l'ADN (méthylation des bases cytosines) ou des protéines avec lesquelles il est en interaction (méthylation, acétylation des histones) sont autant de marques épigénétiques qui peuvent influencer l'expression des gènes en réponse à l'environnement, démontrant que le génome des animaux répond de manière dynamique aux variations du milieu auxquelles chaque individu se trouve exposé.

De nouvelles questions scientifiques se posent donc autour de la relation entre génétique et épigénétique dans le cadre de l'amélioration des espèces animales de rente et leur adaptation aux conditions climatiques changeantes et aux nouveaux systèmes de production durables.

Afin d'avoir une approche complémentaire aux travaux d'épigénétiques déjà existants chez les animaux (transmission intergénérationnelle de marques épigénétiques induites par la nutrition, la chaleur ou les traitements hormonaux), nous avons choisi pour ce projet expérimental de considérer le niveau de méthylation global des bases cytosines de l'ADN comme un caractère quantitatif d'intérêt. Nous avons déjà montré que ce taux de méthylation de l'ADN mesuré dans le sang est variable entre individus et héritable. L'objectif de ce projet est de sélectionner des animaux présentant soit des niveaux élevés ou des niveaux faibles de méthylation de l'ADN sanguin afin de créer des lignées génétiques divergentes. Pour cela trois prises de sang sont effectuées à 2 semaines d'intervalle sur 800 agneaux autour du sevrage (entre 1 et 2 mois d'âge). Ces échantillons permettent d'extraire de l'ADN pour les mesures de méthylation. Ces données permettront de sélectionner 140 femelles et 14 mâles (génération zéro, G0) pour réaliser des croisements orientés entre ces animaux à l'âge reproductif (10 mois) et créer une lignée « haut niveau de méthylation » (70 femelles, 7 mâles) et une lignée « bas niveau de méthylation » (70 femelles, 7 mâles). Tous les agneaux nés de ces accouplements (environ 230 agneaux de la génération 1, G1) auront à leur tour la série de 3 prises de sang afin d'établir leur taux de méthylation de l'ADN. Environ, 60 femelles et 6 mâles G1 seront conservés par lignée en tant que reproducteurs pour la génération suivante (G2). Ces animaux sélectionnés G1 donneront naissance à environ 200 agneaux G2. Le projet expérimental concerne donc un total de 1230 agneaux. A la suite de ce projet, il faudra attendre l'âge de 2 ans des animaux G2 afin d'évaluer l'efficacité d'une telle sélection et ses impacts en termes de paramètres zootechniques et d'adaptation à l'environnement (condition d'élevage, température).

Lors de ce projet, la règle des 3R sera suivie ainsi :

- Remplacement : La caractérisation des agneaux, la réalisation et le suivi d'accouplement orientés, ne peuvent se faire que par l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative existe.
- Réduction : La réalisation de 3 prises de sang par animal constitue le minimum d'échantillons nécessaires pour établir de façon robuste le niveau de méthylation de l'ADN propre à chaque animal. Le choix des 154 animaux G0 est raisonné par une forte pression de sélection de 10% par lignée, soit 800 agneaux à tester au départ, puis 230 agneaux G1 issus des accouplements G0 et 200 agneaux G2 issus des accouplements G1.
- Raffinement : Les prises de sang jugulaires seront réalisées par du personnel animalier expérimenté et formé pour ce type de gestes. Ce projet sera réalisé en conditions d'élevage respectant le comportement grégaire de cette espèce.

**20195** Le but de cette étude est de déterminer l'impact (nul, positif ou négatif) du cannabidiol (CBD) et du  $\Delta$ 9-tetrahydrocannabinol (THC) issus du cannabis, ainsi que de la nicotine, sur la potentialisation et la dégradation de deux médicaments anticancéreux utilisés contre le cancer du sein. Les résultats obtenus permettront de définir si des co-traitements favorisent l'effet des anti-tumoraux (évitent leur dégradation), ou s'il faut éviter une prise simultanée pouvant diminuer les effets des anticancéreux (favorise leur dégradation). Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent (12% en Europe) et le plus mortel chez la femme. Parmi elles, près de 20% fument, ce qui favorise les métastases du cancer du sein et augmente la mortalité. Le traitement du cancer du sein à l'aide d'anticancéreux présente un enjeu de santé public majeur. Dans ce contexte, nous avons récemment démontré que la morphine affectait de manière dramatique la potentialisation et la dégradation du tamoxifène, un anticancéreux de référence pour le cancer du sein hormono-dépendant chez la femme non ménopausée. En plus de ce composé, l'anastrozole est le deuxième anticancéreux le plus utilisé chez la femme ménopausée. Malheureusement, le tamoxifène et l'anastrozole induisent des effets secondaires incluant des douleurs chroniques articulaires et musculaires conduisant à des soins utilisant des antidouleurs. Ainsi, aux USA, en plus du cannabis récréatif, près de 42% des patientes atteintes d'un cancer du sein sont traitées avec du cannabis médical pour diminuer les effets des

chimiothérapies, hormonothérapies et radiothérapies. En Europe, ce type d'approche est actuellement en plein essor. En effet, CBD et le THC possèdent des propriétés analgésiques et anticancéreuses. Ainsi, ils diminuent les effets secondaires des anticancéreux et ralentissent la progression du cancer. De manière surprenante, bien qu'ils possèdent un métabolisme commun, le THC et le CBD sont utilisés conjointement avec le tamoxifène et l'anastrozole. Cette étude établira si la nicotine, le THC et le CBD possèdent des effets bénéfiques ou délétères sur l'inactivation du tamoxifène et de l'anastrozole *in vivo* en terme d'interactions métaboliques. Si ces travaux sont concluants, une étude utilisant un modèle de cancer du sein chez la souris sera réalisée. Ainsi, dans un cas comme dans l'autre, cela signifie que l'on pourrait réaliser des co-traitements afin de potentialiser l'effet des anti-tumoraux à l'hôpital, soit de prévenir leur prise simultanée afin de ne pas diminuer les effets des anticancéreux.

Concernant l'impact des traitements sur les animaux, aucune gêne n'est attendue lors de cette étude car aucun effet secondaire des anticancéreux et des autres composés n'a été rapporté dans la littérature lors d'un traitement chronique aux doses utilisées.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer : Les modèles de culture cellulaire se heurtent à une transposition dans les modèles intégrés. Dans notre cas, la notion d'interactions médicamenteuses est uniquement applicable dans un modèle intégré et donc chez un animal. En effet, le métabolisme fait intervenir une absorption, distribution, métabolisation et excrétion (ADME) qui sont réalisées dans différents organes et types cellulaires. C'est pour cette raison qu'une approche *in vivo* sur des souris est nécessaire. Dans notre cas, l'impact métabolique est étudié car les produits résultants vont agir sur le cancer. De fait, un modèle de tumeurs induites n'est pas nécessaire à ce stade.

Réduire : Un total de 288 souris BALB/c femelles sera utilisé lors de ces études. Ce nombre correspond au nombre minimal d'animaux par groupe permettant de mettre en évidence une différence statistique.

Raffiner : Les animaux sont placés en cage par groupe de 5 individus. Ils seront maintenus dans un environnement enrichi selon les procédures en vigueur à l'animalerie (barre de bois à ronger, nid) qui permet un bien être optimal des animaux (procédures en vigueur à l'animalerie). D'autre part, nous avons établi des points-limites prédictifs permettant de soustraire l'animal à la souffrance.

Un nombre total d'animaux à tester de 288 souris a été établi et se base sur les approches nécessaires au projet.

**20196** Au cours de leur vie, peu de personnes seront épargnées par des problèmes rhumatologiques, même si les biomédicaments remplacent et/ou complètent les traitements de fond conventionnels, des résistances et des échappements thérapeutiques sont toujours rapportés, ce qui justifie d'explorer de nouvelles pistes physiopathologiques.

En France, l'arthrose génère à elle seule 14 millions de consultations, 300 000 examens complémentaires de radiologie, la pose de 140 000 prothèses totales de hanche et de 90 000 prothèses totales du genou. En 2030, 25 % de la population française souffrira d'une arthrose. Problème majeur de santé publique, l'arthrose ne peut toujours pas être soignée. Hormis les traitements symptomatiques de la douleur (antalgiques) et de l'inflammation (anti-inflammatoires), il n'existe aucun moyen d'en guérir ou de prévenir son installation chez un individu à risque.

Dans l'arthrose, il existe différentes atteintes articulaires, notamment du cartilage articulaire, tissu recouvrant les extrémités osseuses au sein des articulations. La compréhension des mécanismes responsables de ces atteintes est une piste intéressante pour le développement de thérapies anti-arthrosiques. L'objectif de ce projet qui requiert l'emploi d'animaux (souris), est d'évaluer les propriétés anti-arthrosiques des molécules H2G2\_42 et H2G2\_42bis par injection intra-articulaire dans le genou, dans trois modèles expérimentaux d'arthrose distincts permettant chacun d'appréhender un compartiment différent retrouvé dans la pathologie arthrosique humaine.

Il y aura ainsi trois procédures expérimentales: • La première consiste à étudier l'effet des molécules ci-dessus dans un modèle chirurgical de déstabilisation du ménisque médial du genou (DMM), qui

explore l'aspect mécanique, intégré et progressif de la pathologie arthrosique • Ensuite nous regarderons l'effet des molécules dans un modèle inflammatoire d'arthrose (injection intra-articulaire de collagenase), qui explore l'aspect inflammatoire retrouvés chez une partie des patients arthrosiques • Enfin, nous évaluerons l'influence des molécules dans un modèle d'arthrose de douleur induite expérimentalement par injection intra-articulaire d'acide mono iodoacétique (MIA), qui permet d'appréhender le volet de la douleur articulaire, premier motif de consultation des patients arthrosiques. Dans chaque modèle, les molécules seront injectées dans le genou 1 fois par semaine pendant la durée de développement de l'arthrose (8 semaines dans le modèle chirurgical, 6 semaines dans le modèle inflammatoire à la collagénase et 3 semaines dans le modèle MIA), en commençant dès la 1<sup>o</sup> semaine après induction de l'arthrose (traitement préventif). En cas de résultat positif du traitement préventif dans le modèle de déstabilisation du ménisque médial du genou, alors l'effet curatif des molécules sera évalué chez des animaux supplémentaires APRES installation de la pathologie (traitement curatif, après 8 semaines de développement de la pathologie, pour une durée de traitement de 8 semaines).

Réduction : Dans un souci d'éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum de façon à être nécessaire et suffisant pour les études statistiques. Ainsi, un nombre maximum de 248 souris C57BL6 mâles seront utilisées pour ce projet.

Remplacement : Certaines expériences peuvent être menées sur des modèles cellulaires plus ou moins complexe (un ou plusieurs types cellulaires, organoïdes...) mais l'impact d'un traitement potentiel d'une pathologie complexe comme l'arthrose ou de multiples compartiments sont impliqués (mécanique et douleur, notamment) est difficilement appréhendable dans un système non-intégré, ainsi le modèle animal est indispensable à la connaissance des effets sur l'articulation dans son intégralité.

Raffinement : L'induction de l'arthrose (chirurgie, injection-intra- articulaire) ainsi que l'injection des molécules (injection intra-articulaire) seront réalisées sous anesthésie gazeuse. Les souris seront hébergées à 4 par cages ventilées de 500cm<sup>2</sup> minimum. L'enrichissement du milieu se fera avec du papier plissé et des bâtonnets de bois.

Des points limites adaptés à chaque procédure seront évalués de façon très fréquente ont été définis. La durée de chaque procédure d'arthrose a été établie de façon à éviter l'apparition de l'altération de l'état général des animaux. Si l'état général de l'animal devait changer, allant jusqu'à la prostration, l'absence de toilettage ou encore le pelage hérissé, l'animal sera retiré de l'étude, et mis à mort. Le poids sera mesuré de façon bi-hebdomadaire pour les procédures DMM et collagenase, et tri-hebdomadaire pour la procédure MIA, plus sévère. Une perte de poids importante de l'animal servira de point limite (perte de 20% du poids pour une souris donnée, comparativement au poids maximum atteint pour cette même souris au moment de la pesée). Pour le MIA, nous avons établi une limite à 3 semaines avec observation renforcée des animaux.

A l'issu des procédures, les animaux seront mis à mort, et nous récupérerons les articulations du genou chez tous les animaux. Des analyses histologiques (pour mesure le score d'arthrose) et immunohistologiques (pour différents marqueurs protéiques) seront réalisées sur ces genoux.

**20197** 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 sur le mélanome ont également été réalisées chez la souris et ont permis de démontrer une efficacité du traitement. Nous

souhaitons maintenant apporter la démonstration que ce traitement est également efficace sur le carcinome basocellulaire et nous devons déterminer les paramètres optimaux de traitement (quantité de nanoparticules et puissance laser utilisées). Ainsi deux concentrations de nanoparticules associées à 3 puissances laser seront testées de manière à définir l'association la plus efficace. Ces traitements seront testés sur des souris femelles nude auxquelles auront été greffées des cellules humaines de carcinome basocellulaire (TE 354.T), à raison de 5 souris par lots, cela correspondra à 40 souris en incluant un lot contrôle non traité ainsi que 5 souris supplémentaires car la prise de greffe n'est pas de 100%. Les NP seront injectées aux souris lorsque le volume tumoral sera de l'ordre de 100mm<sup>3</sup>.

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*.

Dommages/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.

**20198** L'Hydrocéphalie est une maladie congénitale qui se caractérise par une accumulation anormale de liquide céphalorachidien (L.C.R) provoquant la dilatation des cavités du cerveau ce qui entraîne souvent de graves déficiences neurologiques et mentales. Toutefois, les effets néfastes de l'HC peuvent être réduits si la maladie est détectée et traitée à un stade précoce. Des études récentes ont impliqué le gène des domaines PDZ multiples (MPDZ) dans certaines formes graves de la maladie, sans que l'on connaisse les mécanismes moléculaires associés à cette pathologie. Pour mieux les comprendre, l'étude chez l'animal est indispensable.

Pour cela, nous avons créé récemment une lignée des souris présentant une absence de la protéine MPDZ uniquement dans le cerveau antérieur : la lignée des souris EMX\*MPDZ. L'originalité de cette lignée vient du fait que l'absence de la protéine ne touche pas les cavités du cerveau, la lignée ne présente donc pas d'hydrocéphalie et aucun phénotype dommageable. Dans ce projet, nous voulons identifier la nature exacte des éventuels troubles comportementaux et cognitifs des souris mâles et femelles de la lignée EMX\*MPDZ.

Nous étudierons premièrement les comportements émotionnels, cognitifs et sociaux en utilisant des tests non invasifs et faiblement anxiogènes pour les animaux. Nous testerons l'activité locomotrice, la réaction face à la nouveauté, le niveau d'anxiété, le comportement social et la mémoire. Des études complémentaires utilisant d'autres tests comportementaux plus spécifiques seront réalisées uniquement si des troubles sont détectés dans l'étude préliminaire.

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. Des études "in-vitro" ou "ex vivo" sont effectuées en parallèle de l'utilisation des lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation et mieux comprendre l'impact de l'absence la protéine MPDZ sur le fonctionnement des cellules. Cependant l'étude du comportement des souris ne peut être évalué par des méthodes alternatives.

Réduire : Pour ce projet nous utiliserons une lignée de souris transgénique et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 244 souris (mâles et femelles) 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 15 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Nous réduisons le nombre de souris utilisé en utilisant les mêmes animaux pour l'ensemble des tests comportementaux avec 48h de récupération entre chaque test. Aussi, le projet comporte trois études. Les études complémentaires ne seront réalisées que si les résultats de la première étude le requièrent.

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).

**20199** La surdité est le déficit sensoriel le plus fréquent chez l'homme et on estime qu'environ 80 % des cas de surdité neurosensorielle ont une cause génétique. Si les recherches ont relativement bien évolué ces dernières années, il n'existe pas encore de traitement curatif de la surdité. Récemment, des mutations du gène des domaines PDZ multiples (MPDZ) et du gène GPSM2 (ou mPins chez la souris) ont été décrites comme étant responsables de certaines formes de surdités. Pour mieux les comprendre, l'étude chez l'animal est indispensable.

Pour cela, nous avons créé deux lignées des souris présentant une délétion dans l'oreille interne soit du gène MPDZ (la lignée de souris Foxg1\*MPDZ), soit des 2 gènes MPDZ et GPSM2 (la lignée de souris Foxg1\*MPDZ\*mPins). Ces lignées ne présentent aucun phénotype dommageable. Dans ce projet, nous voulons identifier la nature exacte des éventuels troubles auditifs et vestibulaires des souris mâles et femelles des deux lignées en utilisant des tests non invasifs et faiblement anxiogènes pour les animaux. Nous testerons ainsi l'activité locomotrice et l'équilibre des animaux. Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Des études "in-vitro" ou "ex vivo" sont effectuées en parallèle de l'utilisation des lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation et mieux comprendre l'impact de l'absence des protéines MPDZ et mPins sur le fonctionnement des cellules. Cependant l'étude du comportement des souris ne peut être évalué par des méthodes alternatives.

Réduire : Pour ce projet nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 60 souris (mâles et femelles) 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 15 animaux par groupe est nécessaire pour notre étude. Nous réduisons le nombre de souris utilisées en utilisant les mêmes animaux pour l'ensemble des tests comportementaux avec 48h de récupération entre chaque test. Aussi, les mêmes animaux seront testés plusieurs fois au cours de leur vie.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subies 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).

**20200** L'Accident Vasculaire Cérébral ou AVC est la deuxième cause de mort, la première cause de handicap et représente un problème majeur de Santé Publique. La fibrinolyse (dissolution du caillot sanguin) est le seul traitement aujourd'hui disponible en Clinique mais n'est applicable que pour 5% des patients. À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement neuroprotecteur dont l'efficacité en matière de prévention des lésions cérébrales causées par un AVC n'a été démontrée en clinique, d'où le besoin de rechercher des stratégies thérapeutiques alternatives contre cette pathologie. Il est connu que le cerveau peut se réparer après une atteinte neurologique grâce à sa capacité à



induire la formation de nouveaux neurones fonctionnels appelée neurogenèse adulte spontanée. La stimulation de ce mécanisme de neurogenèse pourrait être une stratégie prometteuse pour mettre au point des traitements efficaces face à l'AVC. Dans ce contexte, certaines préparations issues de la Médecine Traditionnelle Chinoise (MTC) se sont révélées intéressantes en clinique dans le cadre de l'AVC. Cette "médecine chinoise" joue en effet un rôle important dans la santé et la prévention de nombreuses maladies depuis des milliers d'années en Asie. Son efficacité thérapeutique est habituellement attribuée à la propriété synergique de multiples constituants végétaux qui agissent sur plusieurs cibles pharmacologiques.

L'objectif de ce projet est de 1/ caractériser les effets potentiellement protecteurs d'une nouvelle formulation MTC simplifiée, composée de seulement 4 plantes et issue d'un cocktail à 9 plantes (dont notre laboratoire a validé les propriétés neuroprotectrices et neurorégénératives) dans un modèle d'ischémie focale transitoire, mimant l'AVC, 2/ analyser la récupération fonctionnelle des souris par des tests moteurs et cognitifs, classiquement utilisés au laboratoire et 3/ de comprendre les mécanismes d'action de la formulation, avec un focus sur l'induction de la neurogenèse (formation de nouveaux neurones), la synaptogenèse (formation de nouvelles synapses), de facteurs neurotrophiques, les voies de signalisation connues dans la survie cellulaire et la réduction de l'inflammation. Dans ce projet, le modèle d'ischémie focale consistant en l'occlusion de l'artère cérébrale moyenne (MCAO) sera utilisé, modèle de référence chez la souris, validé et majoritairement utilisé dans les recherches sur l'AVC. Le choix de la souche s'est porté sur la lignée C57Bl/6J, car c'est la plus renseignée dans la littérature pour le modèle choisi. Notre laboratoire a été choisi pour effectuer la validation préclinique de cette nouvelle formulation et d'en comprendre ses mécanismes d'action, afin de pouvoir mettre en place des essais cliniques aux USA et en Europe (dépôt à la Food and Drug Administration en cours).

L'ensemble des expériences prévues nécessitera l'utilisation d'environ 4704 souris C57Bl/6J sur 5 ans tous tests confondus.

Remplacement : Dans une perspective de remplacement, nous avons réalisé en premier lieu des expériences sur cultures de neurones qui ont permis de déterminer la dose efficace du produit d'intérêt. Néanmoins l'approche *in vivo* est indispensable à notre projet et des animaux subiront la procédure d'ischémie focale afin de mesurer l'effet du traitement sur le tissu cérébral. Ce tissu est complexe, constitué de différents types cellulaires. Il reçoit une vascularisation élaborée et forme des régions structurellement et fonctionnellement très différentes. Aucune approche *in vitro* ou *ex vivo* ne permet de réunir l'ensemble de ces caractéristiques qui influencent toutes les variables auxquelles nous nous intéresserons. De plus, une partie du projet consiste à réaliser des tests comportementaux uniquement possibles sur animaux.

Réduction : Ce nombre relativement élevé d'animaux à utiliser s'explique par le fait qu'il est indispensable de réaliser la plupart des procédures expérimentales planifiées sur des animaux naïfs. De plus, dans un souci de répétabilité chaque expérience (ischémie focale) et chaque test comportemental est effectué au moins deux fois avec des animaux naïfs. Le nombre d'animaux sera réduit le plus possible tout en conservant un nombre d'individus suffisant pour avoir des statistiques fiables. L'effort de réduction sera réalisé en collectant le plus d'informations possibles sur chaque animal. Ainsi, lorsque cela sera possible, plusieurs marquages histologiques seront effectués sur le même animal. Par ailleurs, le nombre de souris nécessaire pour mener à bien ce projet a été déterminé par une méthode statistique qui permet de le réduire au maximum tout en permettant de détecter des effets suffisamment forts pour être intéressants.

Raffinement : Outre l'enrichissement du milieu qui est de nature réglementaire, nos mesures de raffinement consisteront en un suivi resserré des animaux selon une grille de bien-être comportant des critères permettant une prise en charge précoce et adaptée de toute souffrance (points limites). En l'occurrence, les gestes de chirurgie seront accompagnés de protocoles d'anesthésie et d'analgésie appropriés.

**20201** Le syndrome métabolique désigne la coexistence de plusieurs troubles de santé d'origine lipidique, glucidique ou vasculaire associés à un excès de poids, chez un même individu. Les anomalies

caractérisant le syndrome métabolique sont un tour de taille élevé, un excès de sucre dans le sang, un excès des triglycérides dans le sang, une pression artérielle élevée et un taux bas de « bon » cholestérol. L'ensemble de ces désordres métaboliques augmente considérablement le risque de diabète de type 2, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral. Il n'existe pas de traitement efficace contre ce trouble hormis la metformine (qui est un sensibilisateur à l'insuline) ou des traitements de facteurs de risque cardiovasculaire. Dans les pays développés, la prévalence du syndrome métabolique est supérieure à 40% chez les sujets de plus de 50 ans.

L'obésité est considérée comme un facteur de risque majeur pour des maladies chroniques telles que les maladies coronariennes et l'hypertension, le diabète de type 2 et certains types de cancers. L'obésité concerne 17% des adultes en France et sa prévalence est en constante augmentation. Son degré de sévérité est à la fois associé à une composante génétique, à une diminution de l'activité physique mais aussi à des modifications des habitudes alimentaires. De plus, l'obésité est aussi liée à une augmentation de risque de développer des problèmes mentaux comme la dépression ou l'addiction. Actuellement, les traitements les plus efficaces contre l'obésité, sur le long terme, restent les chirurgies gastriques. Comme ces techniques sont très invasives, d'autres méthodes sont actuellement en cours d'étude comme la prise d'hormones régulant la satiété et la prise alimentaire. Depuis quelques années, il est également suggéré que des restrictions alimentaires pourraient aider à la prévention et au traitement de l'obésité et des dysfonctionnements liés à l'obésité. Par exemple, un jeûn intermittent pourrait être une méthode efficace à la fois chez l'humain et chez les animaux pour réduire la masse corporelle et la masse grasseuse tout en maintenant la masse maigre. La période de mise à jeûn des animaux variera entre 6 et 12 heures : une mise à jeûn pendant 6 heures permet d'étudier les effets à très court terme d'une restriction alimentaire tandis qu'une mise à jeûn pendant 12 heures semble plutôt mimer les effets de la famine. Les personnes atteintes de diabète de type 2 sécrètent de l'insuline mais cette hormone régule avec moins d'efficacité le taux de sucre dans leur sang. Ce taux appelé glycémie reste anormalement élevé après un repas. Le diabète de type 2 touche surtout les personnes en surpoids ou obèses, sédentaires, le plus souvent après 45 ans. Il représente 90% des cas de diabète après 60 ans. L'enjeu est d'identifier la génétique et les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique et de ses maladies associées afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de ce trouble.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au syndrome métabolique lorsque les animaux sont nourris par un régime riche en lipides, glucides et cholestérol. Ces modèles murins ont une prise pondérale rapide et facile à observer ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes du syndrome métabolique et ses pathologies associées. Les modèles alternatifs ne permettent pas d'étudier les conséquences d'un régime riche en lipides, en sucre et en cholestérol.

L'objectif du présent projet est d'induire un syndrome métabolique chez les rats et les souris grâce à une alimentation riche en lipides, en glucides et en cholestérol. Le projet consiste également à la mise en place de protocoles de restrictions alimentaires et de mise à jeun dans l'optique d'une prévention ou d'un traitement de l'obésité. L'ensemble de ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles métaboliques et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que les 5 années du projet, un total de 5520 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

**20202** Le syndrome métabolique désigne la coexistence de plusieurs troubles de santé d'origine lipidique, glucidique ou vasculaire associés à un excès de poids, chez un même individu. Les anomalies caractérisant le syndrome métabolique sont un tour de taille élevé, un excès de sucre dans le sang, un excès des triglycérides dans le sang, une pression artérielle élevée et un taux bas de « bon » cholestérol. L'ensemble de ces désordres métaboliques augmente considérablement le risque de diabète de type 2, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral. Il n'existe pas de traitement efficace contre ce trouble hormis la metformine (qui est un sensibilisateur à l'insuline) ou des traitements de facteurs de risque cardiovasculaire. Dans les pays développés, la prévalence du syndrome métabolique est supérieure à 40% chez les sujets de plus de 50 ans.

L'obésité est considérée comme un facteur de risque majeur pour des maladies chroniques telles que les maladies coronariennes et l'hypertension, le diabète de type 2 et certains types de cancers. L'obésité concerne 17% des adultes en France et sa prévalence est en constante augmentation. Son degré de sévérité est à la fois associé à une composante génétique, à une diminution de l'activité physique mais aussi à des modifications des habitudes alimentaires. De plus, l'obésité est aussi liée à une augmentation de risque de développer des problèmes mentaux comme la dépression ou l'addiction. Actuellement, les traitements les plus efficaces contre l'obésité, sur le long terme, restent les chirurgies gastriques. Comme ces techniques sont très invasives, d'autres méthodes sont actuellement en cours d'étude comme la prise d'hormones régulant la satiété et la prise alimentaire. Depuis quelques années, il est également suggéré que des restrictions alimentaires pourraient aider à la prévention et au traitement de l'obésité et des dysfonctionnements liés à l'obésité. Par exemple, un jeûn intermittent pourrait être une méthode efficace à la fois chez l'humain et chez les animaux pour réduire la masse corporelle et la masse grasseuse tout en maintenant la masse maigre. La période de mise à jeûn des animaux variera entre 6 et 12 heures : une mise à jeûn pendant 6 heures permet d'étudier les effets à très court terme d'une restriction alimentaire tandis qu'une mise à jeûn pendant 12 heures semble plutôt mimer les effets de la famine. Les personnes atteintes de diabète de type 2 sécrètent de l'insuline mais cette hormone régule avec moins d'efficacité le taux de sucre dans leur sang. Ce taux appelé glycémie reste anormalement élevé après un repas. Le diabète de type 2 touche surtout les personnes en surpoids ou obèses, sédentaires, le plus souvent après 45 ans. Il représente 90% des cas de diabète après 60 ans. L'enjeu est d'identifier la génétique et les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique et de ses maladies associées afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de ce trouble.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au syndrome métabolique lorsque les animaux sont nourris par un régime riche en lipides, glucides et cholestérol. Ces modèles murins ont une prise pondérale rapide et facile à observer ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes du syndrome métabolique et ses pathologies associées. Les modèles alternatifs ne permettent pas d'étudier les conséquences d'un régime riche en lipides, en sucre et en cholestérol.

L'objectif du présent projet est d'induire un syndrome métabolique chez les rats et les souris grâce à une alimentation riche en lipides, en glucides et en cholestérol. Le projet consiste également à la mise en place de protocoles de restrictions alimentaires et de mise à jeun dans l'optique d'une prévention ou d'un traitement de l'obésité. L'ensemble de ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles métaboliques et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de

constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que les 5 années du projet, un total de 92400 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

**20203** Le syndrome métabolique désigne la coexistence de plusieurs troubles de santé d'origine lipidique, glucidique ou vasculaire associés à un excès de poids, chez un même individu. Les anomalies caractérisant le syndrome métabolique sont un tour de taille élevé, un excès de sucre dans le sang, un excès des triglycérides dans le sang, une pression artérielle élevée et un taux bas de « bon » cholestérol. L'ensemble de ces désordres métaboliques augmente considérablement le risque de diabète de type 2, de maladies cardiaques et d'accident vasculaire cérébral. Il n'existe pas de traitement efficace contre ce trouble hormis la metformine (qui est un sensibilisateur à l'insuline) ou des traitements de facteurs de risque cardiovasculaire. Dans les pays développés, la prévalence du syndrome métabolique est supérieure à 40% chez les sujets de plus de 50 ans.

L'obésité est considérée comme un facteur de risque majeur pour des maladies chroniques telles que les maladies coronariennes et l'hypertension, le diabète de type 2 et certains types de cancers. L'obésité concerne 17% des adultes en France et sa prévalence est en constante augmentation. Son degré de sévérité est à la fois associé à une composante génétique, à une diminution de l'activité physique mais aussi à des modifications des habitudes alimentaires. De plus, l'obésité est aussi liée à une augmentation de risque de développer des problèmes mentaux comme la dépression ou l'addiction. Actuellement, les traitements les plus efficaces contre l'obésité, sur le long terme, restent les chirurgies gastriques. Comme ces techniques sont très invasives, d'autres méthodes sont actuellement en cours d'étude comme la prise d'hormones régulant la satiété et la prise alimentaire. Depuis quelques années, il est également suggéré que des restrictions alimentaires pourraient aider à la prévention et au traitement de l'obésité et des dysfonctionnements liés à l'obésité. Par exemple, un jeûn intermittent pourrait être une méthode efficace à la fois chez l'humain et chez les animaux pour réduire la masse corporelle et la masse grasseuse tout en maintenant la masse maigre. La période de mise à jeûn des animaux variera entre 6 et 12 heures : une mise à jeûn pendant 6 heures permet d'étudier les effets à très court terme d'une restriction alimentaire tandis qu'une mise à jeûn pendant 12 heures semble plutôt mimer les effets de la famine. Les personnes atteintes de diabète de type 2 sécrètent de l'insuline mais cette hormone régule avec moins d'efficacité le taux de sucre dans leur sang. Ce taux appelé glycémie reste anormalement élevé après un repas. Le diabète de type 2 touche surtout les personnes en surpoids ou obèses, sédentaires, le plus souvent après 45 ans. Il représente 90% des cas de diabète après 60 ans. L'enjeu est d'identifier la génétique et les mécanismes physiologiques du syndrome métabolique et de ses maladies associées afin d'en déduire les stratégies thérapeutiques les plus efficaces pour freiner, voire stopper la progression de ce trouble.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés au syndrome métabolique lorsque les animaux sont nourris par un régime riche en lipides, glucides et cholestérol. Ces modèles murins ont une prise pondérale rapide et facile à observer ce qui en fait un modèle de choix pour l'étude des mécanismes du syndrome métabolique et ses pathologies associées. Les modèles alternatifs ne permettent pas d'étudier les conséquences d'un régime riche en lipides, en sucre et en cholestérol.

L'objectif du présent projet est d'induire un syndrome métabolique chez les rats et les souris grâce à une alimentation riche en lipides, en glucides et en cholestérol. Le projet consiste également à la mise en place de protocoles de restrictions alimentaires et de mise à jeun dans l'optique d'une prévention ou d'un traitement de l'obésité. L'ensemble de ces études pourraient permettre d'identifier des substrats moléculaires et biologiques caractéristiques des troubles métaboliques et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques. Afin de satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés avec des conditions optimales de température et d'hygrométrie avec un cycle jour/nuit de 12h/12h. De plus, un enrichissement sera systématiquement placé dans chaque cage et le personnel sera habilité à réaliser les différentes procédures dans le respect des règles d'éthique, de bien-être animal et du principe des 3R. Les surveillances quotidiennes des animaux permettront d'identifier d'éventuels animaux en souffrance

et de prendre les mesures appropriées (surveillance accrue, mise à mort dans les cas les plus graves). Le nombre d'animaux est calculé selon les protocoles expérimentaux de manière à obtenir le minimum d'animaux par groupe permettant des résultats significatifs et homogènes. Afin de constituer les différents lots expérimentaux il est estimé que les 5 années du projet, un total de 92400 animaux est nécessaire. Les espèces utilisées seront les souris et les rats.

**20204** Le lycée forme des élèves au métier de technicien animalier de laboratoire. Au cours de leur cursus (3 années nécessaires à la formation bac pro ce qui constitue 75 élèves par an). Ils acquièrent les capacités qui leurs seront indispensables dans leur futur métier. Outre des cours théoriques, des vidéos et des entraînements sur des supports inertes (remplacement), il est nécessaire de consacrer une partie de la formation à l'entraînement sur modèle animal. Pour cela, ils pratiquent régulièrement des gestes techniques, dans un premier temps sur des modèles en silicone puis, dans un second temps sur animaux vigiles (souris et rat de laboratoires d'élevage agréés) afin d'acquérir la dextérité nécessaire au maintien du bien-être animal (raffinement). Le nombre maximum d'animaux est estimé à 400 animaux (200 souris ,200 rats) pour les 5 ans. Ce nombre est diminué au maximum pour répondre à la réduction du nombre d'animaux utilisés conformément à la loi mais ne peut être inférieur vu le nombre d'élèves à former. Il est également limité en fonction de la place dans la pièce d'hébergement pour éviter une surpopulation. Après avoir acquis les bases du métier (contention et entretien des animaux et de l'animalerie), ils réalisent une succession d'actes couramment pratiqués en expérimentation animale :

- Des identifications : tatouage, bague d'oreille
- Des injections courantes pour prodiguer des soins ou des traitements.
- Pour les prélèvements : de sang pour surveiller l'état sanitaire des animaux.

Tous ces actes sont réalisés dans le respect du bien-être animal avec une progression de la difficulté des manipulations qui est adaptée par le professeur de zootechnie en fonction des groupes d'élèves en travaux pratiques. Ces groupes sont restreints (12 élèves maximum) ce qui permet un suivi individualisé de chaque apprenant et par conséquent de chaque animal utilisé. Pour favoriser ce suivi de l'animal, des procédures strictes doivent être respectées par les élèves, notamment au niveau de la vérification des animaux et de leur utilisation précédente. Lors de chaque procédure, chaque animal est identifié individuellement et bénéficie de 24h de repos au minimum entre deux procédures. Un tableau d'utilisation des animaux est réalisé dans ce sens afin que les élèves puissent évaluer si l'animal peut participer à une nouvelle procédure tout en respectant l'éthique.

Une phase d'adaptation dans les locaux d'hébergement est prévue. Les animaux seront réunis à plusieurs par cage afin de favoriser le bien-être animal.

Les enseignants de zootechnie sont très attentifs au bien-être en essayant de l'améliorer constamment et de l'inculquer aux élèves. De plus, ils augmentent cet aspect du bien-être animal en favorisant la règle des 3R. L'objectif de la règle des 3R est de remplacer autant que faire se peut les expériences sur les animaux, de maintenir aussi bas que possible le nombre de ces expériences et de n'utiliser que la quantité d'animaux nécessaire. Enfin, il faut veiller à ce que les contraintes causées aux animaux soient aussi faibles que possible.

**20205** 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, 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'atteinte cornéenne. Ces atteintes vont de la simple sécheresse oculaire jusqu'à des pathologies cécitantes comme la kératite neurotrophique. L'atteinte de l'innervation cornéenne est fréquemment responsable des atteintes cornéennes entraînant une baisse importante d'acuité visuelle. Cette atteinte de l'innervation cornéenne peut être secondaire à de nombreuses pathologies infectieuses ou inflammatoires de la cornée. Aucun traitement n'est actuellement disponible en routine malgré le nombre important de patients atteints.

Le développement de l'innervation cornéenne a été principalement étudié sur des modèles de poulet et peu d'études ont été réalisées sur la souris. La cornée contient des cellules immunitaires (macrophages) qui pourraient interagir avec les axones en développement comme elles le font dans le système nerveux central notamment en régulant la formation des branches axonales. Les macrophages et monocytes peuvent être visualisés en utilisant des souris transgéniques. Le développement des nerfs cornéens et leurs interactions avec les cellules et immunitaires de la cornée, n'ont pas été étudiés avec des techniques modernes et par des approches qui permettaient d'envisager de suivre ces processus de manière dynamique et ainsi de limiter le nombre d'animaux nécessaires à des études longitudinales. De nouvelles techniques utilisant des souris transgéniques exprimant des protéines fluorescentes dans les nerfs cornéens pour les visualiser ont été développées. Nous proposons de combiner l'imagerie en temps réel des nerfs et d'autres cellules cornéennes. Une étape de mise au point est encore nécessaire et constituera la 1ère partie de notre projet. Notre projet a pour objectif d'étudier de façon longitudinale l'innervation de la cornée lors du développement, puis la réinnervation après induction de lésions. Ainsi que les interactions entre les nerfs de la cornée avec les cellules immunitaires ou encore l'épithélium cornéen.

Au maximum, 852 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 de la complexité de l'innervation cornéenne et des interactions avec les cellules immunitaires et le tissu épithélial de la cornée, 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 requis pour pouvoir atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus. Un test de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre d'animaux requis pour ce projet.

- (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. Nous observerons également une période d'acclimation entre l'arrivée des animaux et le début des procédures expérimentales. Les procédures expérimentales seront réalisées sous anesthésie générale et analgésie. Des points limites précoces ont été fixés pour limiter la gêne et éviter la souffrance des animaux.

**20206** Le tissu osseux a la capacité de se réparer suite à des petites fractures. En revanche, dans le cas de gros défauts osseux dits critiques, dus à des traumatismes, ou des infections, l'os ne peut pas se réparer seul car la cavité à combler est trop importante. Pour ces patients, les chirurgiens utilisent en général des greffes, mais la quantité d'os disponible est faible et il existe un risque de transmission de pathologies. Pour pallier ce problème, de nombreux biomatériaux sont développés en laboratoire dans le but de combler le défaut mais peu d'entre eux s'avèrent réellement efficaces. Pour les améliorer, il est nécessaire de comprendre la physiologie osseuse, et les étapes de la réparation. Le réseau sanguin est important et organisé dans les os longs, et son développement est régulé par de nombreux facteurs qui ne sont pas encore tous connus. Le but de cette étude est d'imager le réseau sanguin d'os longs de souris à différents âges, à l'aide d'une technique appelée transparisation. Une analyse du taux d'oxygène dans l'os sera conduite en parallèle.

Remplacement : il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant d'étudier la physiologie osseuse d'une manière aussi précise.

Réduction : ces expériences sont conçues pour limiter le nombre d'animaux à 8 par groupe d'âges, en utilisant des tailles de groupes basées sur des travaux antérieurs et permettant des comparaisons statistiques, soit un total de 24 animaux pour les trois groupes d'âge.

Raffinement : les animaux seront produits et élevés à l'animalerie, en groupe et dans des conditions de milieu enrichi. Lorsqu'ils auront atteint l'âge attendu, deux injections seront réalisées avant le sacrifice effectué sous anesthésie et analgésie profondes.

**20207** L'anévrisme de l'aorte abdominale (AAA) est une dilatation anormale de l'aorte, le plus gros vaisseau de l'organisme. Il s'agit d'une maladie fréquente puisque 12% des hommes de plus de 74 ans sont atteints. Le risque principal est la rupture, se traduisant par une hémorragie interne, mortelle dans 80% des cas.

L'inflammation a un rôle central au cours de l'initiation et de la progression de l'AAA. Un des acteurs essentiels du développement de cette réponse inflammatoire est le Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1 (TREM-1). Ce récepteur (protéine capable de se lier spécifiquement à un composé biologique et d'émettre un message) est capable d'amplifier l'inflammation. TREM-1 est présent à la surface des cellules immunitaires circulantes ainsi qu'à la surface des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses (cellules composant la paroi des vaisseaux sanguins).

Notre hypothèse est que TREM-1 est impliqué dans le développement et la perpétuation de l'inflammation au cours de l'AAA et que son inhibition permettrait de limiter la progression de l'anévrisme.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous développerons chez la souris un modèle d'AAA par combinaison de deux modèles chirurgicaux déjà connus (mais qui utilisés seuls n'apportent qu'une des composantes de l'inflammation) qui permettra de déclencher au mieux les processus complexes de l'inflammation associée à la physiopathologie humaine de l'AAA. Chacun des deux modèles utilisé seul (modèle élastase et modèle chlorure de calcium) servira de référence par rapport au nouveau modèle combiné.

Nous avons développé un plan expérimental, sur la base d'études statistiques, en trois phases avec 84 souris C57BL/6 âgées de 10 semaines. La première phase sera composée de 20 souris, et nous permettra de mettre au point et d'optimiser la double approche chirurgicale afin d'anticiper et de réduire au maximum les éventuelles difficultés post-opératoires et le mal être animal pour la suite de l'étude. La seconde phase sera composée de 32 souris réparties en quatre groupes : groupe contrôle, groupe élastase, groupe chlorure de calcium, groupe élastase + chlorure de calcium. Cette phase nous permettra de comparer les lésions anévrismales générées par les deux modèles de façon séparée ou combinée. La troisième phase sera composée de 32 souris réparties en quatre groupes : groupe contrôle de souris 'sauvages', groupe contrôle de souris n'exprimant pas le récepteur TREM-1, groupe élastase + chlorure de calcium de souris 'sauvages' et groupe élastase + chlorure de calcium de souris n'exprimant pas le récepteur TREM-1. Cette troisième phase nous permettra d'étudier le rôle de TREM-1 au cours de l'AAA.

Pour les deux procédures chirurgicales, les souris des groupes élastase recevront une perfusion intra-aortique d'élastase et l'extérieur de l'aorte sera imbibée de sérum physiologique. Les souris des groupes chlorure de calcium recevront une perfusion intra-aortique de sérum physiologique et l'extérieur de l'aorte sera imbibée de chlorure de calcium. Les souris des groupes élastase + chlorure de calcium recevront une perfusion intra-aortique d'élastase et l'extérieur de l'aorte sera imbibée de chlorure de calcium. Les souris des groupes contrôles recevront une perfusion intra-aortique de sérum physiologique et l'extérieur de l'aorte sera imbibée de sérum physiologique.

Avant la chirurgie puis 7 et 14 jours après la chirurgie, une échocardiographie (procédure 3) sera réalisée sous anesthésie gazeuse afin d'observer la taille de la lésion anévrismale. Enfin, 14 jours après la chirurgie, les souris seront à nouveau anesthésiées pour un prélèvement de sang (procédure 4) puis mises à mort immédiatement après, afin de prélever l'aorte et la rate pour analyser le degré de sévérité de l'AAA et l'implication de l'inflammation.

Notre projet est en accord avec la règle des 3R :

Raffiner : Toutes les interventions chirurgicales seront réalisées après prémédication à la buprénorphine et sous anesthésie générale et une afin de limiter la douleur de l'animal. Une analgésie avec de la buprénorphine (0,1 mg/kg) sera réalisée en pré- et post-opératoire. Les animaux seront surveillés en continu pendant les 3h suivant la chirurgie jusqu'à leur réveil, puis surveillés quotidiennement, maintenus sans isolement en cages équipées d'enrichissements afin

d'éviter tout stress supplémentaire. L'entretien des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées.

Réduire : le plan expérimental a été prévu et le nombre de souris par groupe a été réduit au maximum de façon à être nécessaire et suffisant pour les études statistiques.

Remplacer : ce projet repose sur des résultats prometteurs obtenus sur cultures cellulaires humaines.

Cependant, nous ne pouvons pas remplacer les modèles *in vivo*, complexes, par des modèles *in silico* (recherches informatisées) ou *in vitro* (recherches sur cellules ou tissus) car nous souhaitons nous rapprocher des conditions cliniques afin d'appréhender les éventuelles modifications de la physiopathologie de l'AAA. Ceci pourrait permettre la transposition de ces résultats chez l'homme dans le futur.

Des points limites ont été définis pour chaque procédure, ainsi qu'une grille de scores pour évaluer les signes d'inconfort potentiels (observation quotidienne) afin d'adopter des mesures de soins adéquats.

**20208** La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire généralisée résultant d'une infection non contrôlée. En dépit de la mise en œuvre des directives internationales, des progrès médicaux constants et des milliards dépensés chaque année, le traitement du sepsis est principalement symptomatique.

Dans ce projet, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'un nouveau composé (LCC-12) au cours du sepsis.

Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles rongeurs de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par administration de lipopolysaccharide (LPS). Les animaux seront répartis en 8 groupes (Contrôle, Contrôle+LCC-12, LPS, LPS+LCC-12, sham, sham+LCC-12, CLP, CLP+LCC-12).

L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les rongeurs (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'Homme au cours du sepsis (remplacement). Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements sanguins et des prélèvements tissulaires (coeur, foie, reins, poumons, surrénales, muscles squelettiques) effectués après euthanasie sur chaque animal.

Nous nous sommes également limités à tester 2 doses du composé (réduction). Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des rongeurs et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement). Au total, nous serons amenés à utiliser 840 rongeurs pour cette étude qui durera 5 ans.

**20209** L'infarctus du myocarde est la première cause de mortalité et de morbidité dans le monde. 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 stimuler la production de monoxyde d'azote (NO). Notre laboratoire a fortement contribué à mettre en évidence le rôle essentiel de l'oxyde nitrique synthase endothéliale (eNOS) myocardique dans la cardioprotection au cours d'un infarctus grâce à l'activité physique. Ce rôle important de l'eNOS dans les effets bénéfiques de l'exercice a depuis fait l'objet de nombreux commentaires et revues dans la littérature scientifique. Cependant, à ce jour, les mécanismes cellulaires aboutissant à l'activation de l'eNOS



demeurent mal compris. D'où l'intérêt de mieux appréhender les différents médiateurs aboutissant à l'activation par l'exercice de la voie de signalisation eNOS-NO. Ainsi, nous nous sommes intéressés au rôle du facteur de croissance des nerfs (NGF) dans la modulation de la production de NO et son rôle dans la cardioprotection.

Le NGF a été découvert pour ses capacités pro-survie et pro-proliférative sur les cellules nerveuses. Mais il a les mêmes capacités les cellules structurales qui sont elles aussi capables de l'exprimer, comme les cellules endothéliales ou les cardiomyocytes. L'expression du NGF est augmentée après un exercice physique ou un entraînement chez l'Homme comme chez l'animal. Il a été montré que le NGF est capable de protéger le cœur lors d'une ischémie-reperfusion (I/R) *in vivo*. De plus, sur des cellules endothéliales, un lien entre le NGF et la production de NO a pu être montré.

Aucune étude ne s'est intéressée à la cardioprotection médiée par l'exercice et au NGF, ni au lien entre NO et NGF au niveau du cœur.

En résumé les objectifs de cette étude sont: (1) Evaluer le rôle du NGF dans le cœur et son action éventuelle sur les NOS et la production de NO ; (2) Evaluer le lien entre la cardioprotection médiée par l'exercice et le NGF.

Pour cela, une ischémie-reperfusion sera réalisée *ex vivo* après avoir retiré le cœur des rats anesthésiés. Les animaux seront traités ou non au préalable avec des anticorps bloquants anti-NGF (ou non-relevant comme contrôle) et ayant ou non été exercés. La fonction cardiaque sera mesurée à l'aide d'un système de mesure *ex vivo* (taille infarctus et récupération fonctionnelle). D'autres animaux permettront d'évaluer les expressions protéiques du NGF, de ses récepteurs, l'expression et des différentes NOS ainsi que leurs formes activées, à l'aide de la technique de western blot. En parallèle, de manière non invasive, une échocardiographie et une vitesse maximale aérobie seront pratiquées sur les animaux.

Au total 186 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 cardiaque au cours de l'ischémie-reperfusion. 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 : Nos travaux préalables ont déjà permis de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires à cette étude et d'identifier des conditions particulières nécessitant l'utilisation d'animaux.

Les nombreuses données que nous pourrons obtenir sur les tissus prélevés (microscopie électronique, biochimie) permettront de limiter au maximum le sacrifice d'animaux. Pour finir, le nombre d'animaux estimé 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, vitesse maximale aérobie), soit provoquant une douleur légère à modérée (injection intra-péritonéale, échocardiographie), ou finalement sans réveil (anesthésie létale suivit d'un prélèvement d'organe). Après euthanasiés par une surdose d'anesthésique (dose létale de pentobarbital sodique, Doléthal : 182mg/kg ; 0,1ml/100g i.p.), les cœurs et tissus seront prélevés afin de pouvoir effectuer les différentes expérimentations, dont, la procédure d'ischémie-reperfusion.

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.

**20210** Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche appliquée en radioprotection des populations dans le domaine des expositions à faibles doses de rayonnement ionisant (RI) et s'intéresse à la recherche des effets biologiques sur la descendance. La période de vie prénatale est une période particulièrement sensible aux agents toxiques et la question du risque encouru par les populations soumises à des expositions médicales (imagerie), post-accidentelles (Tchernobyl et Fukushima-Daiichi) ou militaires (essais atmosphériques d'armes nucléaires) aux rayonnements ionisants durant la grossesse est une thématique majeure de. En effet, les connaissances scientifiques (épidémiologiques et expérimentales) sur les effets des faibles doses d'exposition intra-utérine de RI sont insuffisantes pour pouvoir en estimer le risque pour la santé des enfants. A ce titre, les études épidémiologiques menées sur des territoires contaminés manquent de précision. Quant aux résultats des études expérimentales, ils portent essentiellement sur des situations d'expositions intra-utérines à fortes doses ou à forts débits de doses (aigues ou répétés) et très peu sur les effets des faibles doses. Ce projet s'intéresse donc aux situations d'exposition chroniques à faibles doses des populations vivant sur des territoires contaminés par le césium-137.

Dans ce contexte, la réalisation d'une étude de la relation dose-effet, permettra d'une part de rechercher des effets biologiques d'une exposition de gestationnelle au Cs-137 et d'autre part d'identifier les seuils de doses associés à ces effets.

Les populations sont soumises à différents stress environnementaux qui pour la plupart sont comme les RI, des sources de stress oxydant. Parmi ceux-ci, figure le régime alimentaire qui par des apports énergétiques excessifs et source d'adiposité et de stress oxydant qui peut mener au syndrome métabolique (obésité, diabète, risques cardiovasculaires et neuronaux). L'exposition aux rayonnements ionisants est aussi susceptible de perturber les métabolismes énergétique et lipidiques en élevant le niveau de stress oxydant et la réponse métabolique à un régime alimentaire riche en énergie et aussi source de stress oxydant.

Dans ce projet, l'hétérogénéité intrinsèque d'une population sera prise en compte en s'intéressant à l'effet du sexe, de l'âge (source de stress oxydant) et enfin à l'effet d'un régime alimentaire riche comme source supplémentaire de stress oxydant pour tester sur la capacité que l'individu adulte exposé pendant la phase de gestation aura pour gérer un stress métabolique.

Méthodologiquement, ce projet se concentrera sur la recherche d'effets biologiques aux échelles moléculaires et physiologiques, chez un modèle expérimental toxicologique de souris pour rechercher des effets précoces et tardifs. Les mesures seront réalisées chez l'adulte et en âge de procréer et chez l'animal plus âgé (connu pour avoir un niveau basal de stress oxydant supérieur à celui des jeunes et un métabolisme général diminué).

Les analyses porteront principalement sur le métabolisme énergétique, mais aussi dans un souci de raffinement du modèle employé sur le système endocrinien, les systèmes reproducteur, cardiovasculaire et le système nerveux central (connus pour être particulièrement sensibles aux stress environnementaux). Des tests fonctionnels seront réalisés au cours du protocole, chez l'adulte jeune et âgé et des prélèvements biologiques seront réalisés post-mortem (à l'exception des collectes d'urines qui se feront en cage à métabolisme).

Cette étude sera menée sur une période de 5 ans et engagera un effectif maximal de 2500 souris C57BL/6J pour lesquelles de nombreuses études portant sur les systèmes cardiovasculaire, neuronaux et métabolique sont documentées. Les animaux seront hébergés pour une durée maximale de 15 mois. Pour réduire autant que possible le nombre d'animaux l'effectif expérimental a été estimé par retour d'expérience à partir d'études antérieures. Il tient compte de la variabilité interindividuelle des effets métaboliques observés dans la gamme des faibles doses pour ne pas conduire à produire des résultats statistiquement incertains et être dans l'incapacité à conclure. De l'enrichissement leur sera apporté durant l'ensemble du protocole.

Aucun acte susceptible de provoquer un stress tel qu'une contention ou une douleur ne sera réalisé sans anesthésie préalable. Des points-limites spécifiques ainsi que des critères d'arrêt ont été définis (perte de poids, blessures, signes d'atteinte neurologique, incapacité à boire/manger...). L'ensemble des échantillons collectés seront cryoconservés pour analyses et mise à disposition de la communauté scientifique dans le cadre de travaux collaboratifs.

Ce projet d'étude *in vivo* est un préalable nécessaire à la mise en œuvre d'études *in vitro* qui permettront à terme, de remplacer l'animal par des modèle cellulaires simples ou complexes de substitution pour approfondir les mécanismes d'action des RI au niveau des cibles biologiques identifiées par cette étude. Enfin, l'ensemble de ces études pourraient permettre de modéliser *in silico* les mécanismes biologiques ou toxiques et ainsi permettre de faire évoluer les normes de radioprotection.

**20211** La glycogénose de type 3 (GSD III) est une maladie métabolique et musculaire rare caractérisée par une dégénérescence progressive du foie et des muscles. La fréquence de la maladie est de 1/100000 naissances. GSD III est due à l'absence de l'enzyme de débranchement du glycogène (GDE), enzyme clé dans la dégradation du glycogène, molécule de stockage du glucose dans le foie et les muscles.

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. Avec l'âge les symptômes évoluent. Chez l'adulte, les malades présentent un phénotype musculaire dégénératif alors que le phénotype hépatique s'estompe. Néanmoins, dans les cas les plus sévère, les patients adultes peuvent nécessiter une transplantation du foie. Actuellement, il n'y a pas de traitement pour le phénotype musculaire de la GSD III, mais un régime riche en glucides complexes et en protéines peut ralentir l'évolution de la myopathie.

Notre équipe a précédemment démontré la faisabilité d'une approche de thérapie génique dans la glycogénose de type 3 (GSD III). La thérapie génique consiste à apporter l'information génétique manquante ou altérée chez les patients, généralement via des virus non pathogènes dits virus médicaments. En nous basant sur nos résultats précédents qui ont permis de montrer qu'il est possible de restaurer la force musculaire (Vidal et al, Mol Ther, 2017), nous développons une approche qui permettrait un passage en recherche clinique.

Le but de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'immunogénicité de plusieurs candidats de thérapie génique pour le traitement du phénotype musculaire de la GSD III. L'objectif est de sélectionner un ou plusieurs candidats qui permettrait de restaurer partiellement ou en totalité la force dans les muscles GSD III.

Afin de respecter la règle des trois R, tous nos virus médicaments ont préalablement été testés *in vitro* (Réduction) et seuls ceux ayant montré une expression de la protéine GDE seront utilisés *in vivo*. Néanmoins, les tests *in vitro* ne permettent pas de reproduire toutes les barrières biologiques rencontrées lors de l'injection d'un virus médicament, telle que la réponse immunitaire. Seul un organisme physiologique "entier" permet de démontrer pleinement l'efficacité du(des) candidat(s) et leur potentiel immunogène, 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 : la souris GDE-KO, présentant les mêmes déficiences que celles observées dans les patients atteints de GSD III.

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 60 souris sur 2 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.

Raffinement : Toutes les mesures possibles permettant d'améliorer les conditions de vie des animaux sont prises. Les animaux sont hébergés dans des cages respectant la surface minimale requise de 330cm<sup>2</sup>, avec un accès non-limité à la nourriture et l'eau, un cycle de 12h jour - 12h nuit, une aération, humidité et température de l'air contrôlées. L'environnement est enrichi de rouleaux en carton et de cotons pour que les animaux puissent se faire un nid. Les animaux sont vérifiés tous les jours, par des personnes compétentes dans le domaine de l'expérimentation animale. Les

prélèvements sanguins seront importants pour évaluer l'efficacité de nos vecteurs et seront faits sous anesthésie gazeuse afin de limiter le stress chez les animaux.

Nous espérons ainsi montrer au terme du projet une efficacité thérapeutique de notre meilleur candidat chez la souris afin d'envisager le développement clinique de notre produit.

**20212** L'élevage peut être un levier pour améliorer la durabilité des exploitations bananières en i) valorisant les biomasses végétales présentes sur l'exploitation ; ii) valorisant les effluents d'élevage pour la fertilisation des systèmes de culture. Néanmoins l'élevage de la zone est fortement contraint par la contamination des sols par la chlordécone. Des ateliers de réflexion ont permis de co-construire trois scénarios d'introduction de l'élevage (1) animal pourvoyeur de services multiples pour l'agriculture mais ne pouvant être consommé, (2) animal hors-sol pourvoyeur de fertilité et de viande, (3) animal pourvoyeur de services multiples puis décontaminé pour être consommé. Les animaux seront élevés en condition classique d'élevage (c'est-à-dire: conformes aux bonnes pratiques et dans le respect du bien-être animal en élevage). L'expérimentation a pour ambition i) d'étudier le niveau de contamination des animaux (ovins, caprins, porcins et bovins) élevés en condition d'élevage classique chez les agriculteurs-éleveurs, selon les scénarios 1) et 3) décrits précédemment. Par le biais d'expérimentations en ferme, chez les agriculteurs, nous évaluerons le niveau de contamination des animaux à la chlordécone sur un total de 50 ovins (5 animaux par élevage), 50 porcins (5 animaux par élevage), 50 caprins (5 animaux par élevage) et 50 bovins (5 animaux par élevage). Nous mesurerons la croissance par des pesées, l'adiposité (pour les porcs) par des mesures non invasives d'épaisseur de lard dorsale. Pour pouvoir évaluer le niveau de chlordécone dans l'organisme, il est nécessaire de prélever du tissu sanguin pour doser la chlordécone dans le sérum. Un total de 3 prélèvements par animal pour le scénario 1) (un prélèvement T0 au début, un prélèvement à mi-parcours et un prélèvement en fin d'expérimentation) et 4 prélèvements par animal dans le scénario 3) (en phase de contamination : un prélèvement à mi-parcours et un prélèvement en fin d'expérimentation ; en phase de décontamination : un prélèvement à mi-parcours et un prélèvement en fin d'expérimentation). Les prises de sang seront réalisées à la veine jugulaire après contention de l'animal. En abattoir, des échantillons de tissus cibles (foie, muscle, gras) seront prélevés pour vérifier les teneurs en chlordécone. Les animaux sont logés et alimentés dans de bonnes conditions d'élevage, conformes au bien-être animal, évitant la souffrance, la douleur ou l'angoisse. Dans le cas de signes de douleurs, de souffrance et d'angoisse prolongé, l'animal est isolé et soigné. La règle des 3R a été prise en considération : - Remplacement: l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter sur le niveau de contamination et les durées de décontamination propres à chaque espèce cible- Réduction: un calcul du nombre d'animaux nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'individus à inclure dans le projet, en tenant compte de la variabilité individuelle (n=50 par espèce) et de la variabilité intra-ferme (n=10). Le nombre et la fréquence des prises de sang ont été réduit au minimum. Par ailleurs, des collectes de fèces (par collecte des fèces ramassées lors des pesées), non invasives et non stressantes seront réalisés, afin de vérifier la corrélation entre les dosages de chlordécone dans les fèces qui pourraient remplacer à terme les dosages sanguins. Par ailleurs, les animaux du scénario 1) seront utilisés dans le scénario 3 - Raffinement: les conditions d'hébergement sont raffinées, en plein air comme en hors-sol, avec un élevage en groupe sur une surface suffisante respectant les normes en vigueur, permettant le contact avec les congénères, des aires de repos propres.

**20213** Les cellules souches pluripotentes et la découverte de protocoles de différenciation nous ont permis de développer un biomatériau constitué de 3 types cellulaires différents : les kératinocytes, les fibroblastes et les cellules endothéliales pouvant devenir une solution thérapeutique à l'épidermose bulbeuse ou bien pour les grands brûlés. Cependant ce biomatériau ne doit pas être reconnu par le système immunitaire du receveur et doit être, à tout moment, autodestructif si les cellules qui le constituent se différencient. Ces deux grandes caractéristiques seront évaluées *in vivo* dans des souris immunodéficientes humanisées ou non par l'injection de cellules sanguines humaines. Deux

stratégies immunosuppressives seront évaluées pour chaque constituant cellulaire ainsi que l'efficacité d'un gène suicide.

Ces étapes sont essentielles avant d'envisager un essai clinique chez les patients. Nos collaborateurs ont mené à bien une série de greffes d'épiderme reconstruit leur permettant d'envisager la finalisation de ce projet.

Afin de Réduire le nombre d'animaux, si la question expérimentale est validée avec moins d'animaux qu'initialement prévu, alors les animaux supplémentaires ne seront pas commandés/élevés.

Dans le but du Remplacement, des données préliminaires *in vitro* ont été obtenues mais le devenir de la greffe *in vivo* dans une souris immunodéficiente humanisée est une étape indispensable avant le passage à l'homme. Elle permettra d'apprécier l'immunogénicité de la greffe dans un environnement physiologique (remodelage matriciel, formation des nouveaux vaisseaux, fonctionnalité de l'épiderme formé dans son rôle protecteur).

Enfin, concernant le Raffinement, les chirurgies et les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie et un analgésique sera donné en pré et post-opératoire (buprénorphine 0.05mg/kg). En post opératoire, afin d'éviter toute agression pouvant provoquer des blessures sur la greffe, il sera effectué un isolement des souris en environnement enrichi dans des cages sur portoir ventilé avec des nidifications à base de cartons et de tunnels. Les souris ont accès libre à l'eau et à la nourriture et sont maintenues dans un cycle jour/nuit de 12h/12h.

Au total, 405 souris seront incluses dans cette saisine.

**20214** Les maladies cardio-vasculaires représentent la première cause de mortalité dans les pays industrialisés. Après les maladies coronariennes, l'insuffisance cardiaque (IC) représente la seconde cause de mortalité cardiovasculaire.

L'IC est une maladie progressive qui se caractérise par une incapacité du cœur à assurer un débit de sang suffisant pour couvrir les besoins du corps en oxygène, d'abord en cas d'effort puis même au repos. Malgré la prise en charge des patients, leur pronostic reste mauvais (survie médiane à 2 ans et 75% de mortalité à 5 ans).

Il existe 2 formes d'IC. La plus décrite ces 20 dernières années est la forme dite systolique, soit un défaut de la contraction cardiaque, généralement consécutive à un infarctus. La seconde forme d'IC est due à un défaut de relaxation (forme diastolique) et ses causes sont multiples : âge, hypertension, obésité, diabète, ... De par l'augmentation de l'espérance de vie et l'émergence des comorbidités associées, l'IC diastolique représente 50% des IC diagnostiquées.

Malgré les nombreuses recherches et études cliniques menées ainsi que l'arsenal thérapeutique déployé et testé (béta bloquants, inhibiteurs de l'enzyme de conversion, bloqueurs des récepteurs à l'angiotensine, inhibiteurs des minéralocorticoïdes, ...) aucune thérapie semble être efficace en termes d'allongement de la durée de vie. La mort subite est la cause de mortalité la plus courante (25% des décès) pour cette forme d'IC.

Ainsi émerge la nécessité de développer et d'utiliser de nouveaux modèles animaux présentant des atteintes similaires à celles rencontrées dans l'IC diastolique accompagnées ou non des comorbidités associées. Afin de tester les nouveaux médicaments, différents modèles existent. Les 2 modèles rongeurs faisant l'objet de ce projet sont :

- Modèle d'IC induit pharmacologiquement par l'administration d'isoprotérénol chez le rat sain
- Modèle d'IC induit par l'introduction d'un régime salé chez le rat Dahl à l'origine d'une hypertension artérielle, une hypertrophie cardiaque et d'atteintes rénales ou encore d'accidents vasculaires cérébraux.

Pour chacun des modèles, les animaux feront l'objet d'un suivi de l'évolution de la fonction et du remodelage cardiaque par technique non invasive d'échocardiographie.

Dans ce projet, en tant que prestataire de services pour différents laboratoires pharmaceutiques développant des candidats médicaments, nous sommes responsables de la partie *in vivo* (induction

de la pathologie, administration des composés, suivi des animaux et évaluation de l'efficacité des composés testés). Ainsi, l'utilisation des modèles d'IC présentés dans ce projet a pour but de tester et d'évaluer les effets des nouveaux candidats médicaments de nos sponsors.

Le développement de ces nouveaux modèles va dans un premier temps nécessiter l'utilisation d'animaux (caractérisation et validation), ce nombre est estimé à 225.

L'étude d'efficacité d'un composé constitue une série expérimentale qui comporte 4 groupes d'animaux. Compte tenu de l'éventuelle mortalité, de la durée des protocoles (plusieurs semaines), des variabilités inter-individuelles (réponse à l'induction et/ou au traitement, des données mesurées) le nombre d'animaux par groupe est porté à 15. A raison de 15 séries expérimentales sur 5 ans, le nombre d'animaux utilisé pour ce projet est de 1125 rats.

Le projet présenté s'inscrit dans la règle des 3R.

- Remplacement : l'objectif étant d'obtenir une preuve de concept d'efficacité de ces nouveaux composés *in vivo*, l'utilisation de rongeurs est nécessaire afin d'évaluer l'effet sur un organe entier et les conséquences fonctionnelles à plus long terme (fonction et remodelage cardiaque).

- Réduction : Le développement de ces nouveaux modèles va dans un premier temps nécessiter l'utilisation d'animaux (caractérisation et validation), ce nombre est estimé à 225. Ne possédant pas de données internes préalables, nous nous basons sur les données issues de la littérature, nous fixons le nombre d'animaux par groupe à 15. A raison de 15 séries expérimentales sur 5 ans, le nombre d'animaux utilisé pour les tests d'efficacité est de 900 rats. Soit un total de 1125 animaux pour l'ensemble du projet.

- Raffinement : les animaux seront hébergés par 2 ou 3 (selon la réglementation en vigueur) en présence d'enrichissement. Compte tenu de l'éventuelle sévérité de la pathologie, une attention toute particulière sera portée à l'état de santé des animaux (prise alimentaire et de boisson, suivi du poids, aspect et comportement de l'animal).

L'ensemble des expérimentations sera effectué par un personnel compétent et entraîné et une importance toute particulière sera portée au suivi des animaux afin de prévenir et de remédier au plus vite à toute apparition de douleur ou de mal-être. Les points limites seront également fixés avant le début des expérimentations.

## 20215 Objectifs du projet

L'insuffisance rénale chronique (IRC), est une maladie fréquente. En France, la prévalence chez les adultes est évaluée à 10%. Bien que l'on retrouve souvent les facteurs de risque cardiovasculaire (CV) classiques (hypertension, diabète, obésité, calcifications vasculaires, ...) chez les patients souffrant d'IRC, les données démontrent que l'IRC, même modérée, est un facteur prédictif de la mortalité CV. Malgré les progrès accomplis, les mécanismes régissant les complications de l'IRC ne sont qu'incomplètement compris. Les calcifications vasculaires et valvulaires sont présentes chez plus de la moitié des patients avec IRC et sont en partie responsables de la forte morbi-mortalité CV. Il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents et d'identifier des thérapeutiques permettant de limiter ces calcifications.

L'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) est connue pour réguler la pression artérielle. Il est désormais bien établi qu'une activation inappropriée de son récepteur (RM) s'accompagne de dommages tissulaires. Des données publiées indiquent un rôle bénéfique potentiel des antagonistes du RM dans les calcifications vasculaires, en dehors de l'IRC. Notre hypothèse est que la Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL), une cible modulée par l'aldostérone dans le système cardiovasculaire, soit directement responsable de ces effets. Il a été en effet rapporté également une association entre NGAL et calcification vasculaire (5).

Déroulé du projet

Pour comprendre l'impact du RM et de NGAL sur les calcifications vasculaires associées à l'IRC dans le coeur, l'aorte, les valves nous induirons une IRC et des calcifications induite par un régime riche en phosphate chez 1) des rats et souris commerciales traités avec un antagoniste

pharmacologique du RM (spironolactone), 2) un modèle de rat transgénique avec sur-expression globale du RM humain 3) un modèle de rat avec inactivation globale de NGAL (ces deux modèles sont déjà disponibles et validés au laboratoire).

Pour préciser les mécanismes sous-jacents, les calcifications vasculaires associées à l'IRC seront également étudiées dans des modèles de souris avec inactivation inductible du RM et NGAL dans les cellules endothéliales ou musculaires lisses. Ces modèles sont déjà disponibles et validés au laboratoire.

#### Bénéfices attendus du projet

Nous voulons démontrer le bénéfice de cette classe d'antagonistes et comprendre les mécanismes sous-jacents afin de proposer l'utilisation clinique de ces antagonistes (déjà sur le marché) et stimuler des recherches cliniques dans ce sens

#### Nuisances ou effets indésirables

L'IRC induit une perte de poids modérée (inférieure à 10 %) mais dans notre expérience passée n'induit pas de signes de souffrance chez l'animal ni de comportement social altéré. Ces travaux sont complémentaires de travaux déjà réalisés ex vivo en culture cellulaire de différents types (endothélium, cellules musculaires lisses) qui soutiennent notre hypothèse. Toutefois il n'est pas possible de récapituler dans des cellules en culture les éléments complexes liés à l'IRC ou encore les interactions entre organes qui participent aux effets délétères de l'IRC, effets qui ne peuvent être abordés que chez l'animal.

Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IRC chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe. Le responsable scientifique et les personnes impliquées ont les agréments requis y compris formation chirurgie pour mener à bien le projet

Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

#### Mise en oeuvre des procédures 3R

Remplacement : Ces travaux sont complémentaires de travaux déjà réalisés ex vivo en culture cellulaire de différents types (endothélium, cellules musculaires lisses) qui soutiennent notre hypothèse. Toutefois il n'est pas possible de récapituler dans des cellules en culture les éléments complexes liés à l'IRC ou encore les interactions entre organes qui participent aux effets délétères de l'IRC, effets qui ne peuvent être abordés que chez l'animal.

#### Reduction

D'après notre expérience dans des modèles animaux avec ce modèle d'IRC et en se basant sur la littérature ainsi que sur le résultat d'un logiciel de calcul du nombre d'animaux nécessaire en (G-Power), nous aurons besoin de 10 animaux par groupe par condition expérimentale (animaux commerciaux, contrôles (littérates) ou transgéniques afin de limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différences statistiques entre les résultats. Un total de 360 rats et 440 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans. Afin de limiter au maximum l'utilisation des animaux, les animaux dits "contrôles" pourront servir de contrôles pour plusieurs expériences, ainsi, environ 40 rats et 80 souris ne seront probablement pas utilisés si la reproductibilité des résultats nous le permet.

#### Raffinement

Les mesures de raffinement incluent une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IRC chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisés et utilisés régulièrement dans notre équipe. Le responsable scientifique et les personnes impliquées ont les agréments requis y compris formation chirurgie pour mener à bien le projet

Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont pré-définis et un suivi rigoureux des animaux est mis en oeuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

**20216** Le système immunitaire est activé en cas d'infection par les bactéries et les virus mais également au cours du développement de cancer. Plusieurs études se sont déjà attachées à identifier le rôle des différents globules blancs au cours d'un cancer et d'autres études ont montré que la chimiothérapie pouvait moduler les proportions des différentes populations de globules blancs. Le Cisplatine (une chimiothérapie utilisée dans le traitement des cancers du poumon) recrute des populations particulières de globules blancs, exprimant un marqueur appelé ROR. De nombreux globules blancs peuvent exprimer ROR dont les cellules TCR $\gamma\delta$ . Les cellules TCR $\gamma\delta$  sont des globules blancs qui ont un rôle controversé en cancérologie. Ceci s'explique par le fait que ces cellules sont peu nombreuses et difficiles à étudier avec plusieurs sous-populations.

Afin de déterminer le rôle précis de ces cellules TCR $\gamma\delta$  dans la réponse au cisplatine, nous utiliserons des modèles de souris immunodéficientes. Nous utiliserons des souris ne possédant pas de lymphocytes TCR $\gamma\delta$  et des souris sauvages. Nous pourrions alors vraiment discriminer l'impact de cette cellule sur l'efficacité anti-tumorale du cisplatine lors d'expériences de croissance tumorales. Nous utiliserons un modèle de tumeur : TC-1 (lignée de cancer du poumon) que nous implanterons en sous-cutané sur les souris. La croissance tumorale sera alors suivie 3 fois par semaine et les souris seront mises à mort à la fin de la croissance tumorale, lorsque les tumeurs auront atteint un grand axe de 20mm.

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 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 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, traitements et mise à mort) seront réalisées sous anesthésie, les souris bénéficieront de cages avec de l'enrichissement 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. Des points limites adaptés ainsi que des critères d'arrêt à ces expériences ont été définis. Les souris seront maintenues dans des cages ayant un milieu enrichi. Cette étude nécessitera 40 souris TCR $\gamma\delta$ -/- et 40 souris WT C57Bl6. Cette étude durera 2 ans et utilisera 80 souris au total.

**20217** Ce projet porte sur un virus émergent provoquant une fièvre hémorragique : depuis 2000, l'incidence de la maladie a considérablement augmenté, de même que sa répartition géographique. Il est aujourd'hui endémique en Afrique, en Europe de l'Est, au Moyen Orient et en Asie. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a inscrit cette maladie dans son programme de R&D Blueprint, qui comprend les 8 maladies infectieuses les plus préoccupantes. (<https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-context>)

Les signes cliniques chez l'Homme varient d'un syndrome fébrile non spécifique à une fièvre hémorragique, incluant des dommages vasculaires, une défaillance multi-organique et un choc hémorragique conduisant à une mortalité de l'ordre de 30%. Il n'existe pour l'instant aucun traitement spécifique ni vaccin.

Les recherches permettant de comprendre des aspects clés de la biologie du virus requièrent l'utilisation d'outils spécifiques. Parmi ces outils, certains, tels que des anticorps ciblant de façon spécifique des protéines virales font encore défaut aujourd'hui. Ces anticorps sont pourtant un outil essentiel permettant par exemple d'identifier et de quantifier les protéines virales au cours de



l'infection. Ce projet propose de générer ces outils afin de mieux comprendre ce pathogène émergent.

Les expériences ont été conçues en accord avec le principe de la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement).

Remplacer : Des études *in vitro* ont au préalable été réalisées afin de vérifier l'intérêt d'étudier ces protéines et leur importance dans la biologie de ce virus. Cependant, ces études montrent leur limite en l'absence d'outils appropriés permettant de détecter ces protéines. En effet, seule une étude indirecte est actuellement possible. Des protéines portant une étiquette permettant leur détection avec des anticorps ciblant cette étiquette ont été générées, mais cette technique n'est pas applicable pour toutes les protéines virales. De plus, la présence de cette étiquette peut générer des biais expérimentaux. Il est donc crucial de vérifier les observations à l'aide d'anticorps capables de cibler les protéines non étiquetées. Le seul moyen disponible à l'heure actuelle passe par l'utilisation de souris pour la production d'anticorps ciblant les protéines d'intérêts.

Raffiner : Tout au long des expériences, il sera veillé au bien-être des animaux, à réduire au maximum la douleur en réalisant les prélèvements sanguins et les injections intra musculaire sous anesthésie. Il sera également veillé à réduire la souffrance et l'angoisse des souris grâce à une définition précise des points limites. En cas d'atteinte de ces points limites les animaux seront sortis de l'étude et mis à mort.

Réduire : le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum sans toutefois compromettre l'analyse statistique des résultats. Pour cela nous utiliserons 174 souris.

**20218** Les médulloblastomes sont les tumeurs du cervelet le plus fréquentes chez les enfants. Les médulloblastomes ont une croissance très rapide. Ils se propagent souvent à d'autres zones du système nerveux central par le liquide céphalo-rachidien (LCR) et dans ce cas, ils sont souvent associés à une résistance aux traitements, à des métastases et à des récives. Les traitements incluant la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie ont des effets favorables à court terme, mais jusqu'à 60% des patients à haut risque connaissent une progression de la maladie ou succombent dans les 5 ans avec un impact évident dans la vie des enfants et leurs familles. Il est aujourd'hui admis que les cellules souches de médulloblastomes sont responsables du développement de la tumeur et de la reprise de la croissance tumorale après les traitements et des métastases. Notamment, les cellules souches représentent une population distincte de cellules résistantes aux traitements et sont capables de repeuplement et d'auto-renouvellement à long terme. Plusieurs facteurs de transcription clés, essentiels au maintien de la population cellulaire souche pendant le développement embryonnaire, sont augmentés dans le médulloblastome, prédisent au comportement tumoral agressif, à une résistance aux traitements et donc à une espérance de vie réduite. Notre objectif est de contribuer à l'élaboration de nouvelles thérapies anticancéreuses en induisant la sensibilisation de cellules souches aux chimiothérapies conventionnelles. Pour cela, nous avons montré *in-vitro* que l'inhibition des voies de signalisation activées dans ces cellules souches réduit la prolifération de la tumeur et sensibilise les cellules cancéreuses aux chimiothérapies conventionnelles. Le LDN-193189 présente un intérêt thérapeutique réel puisqu'il est capable de réduire à la fois la taille de la population souche de médulloblastome et d'augmenter leur sensibilité à l'étoposide, la chimiothérapie de référence pour le médulloblastome. Les tests de toxicité ont montré que cette molécule n'induit pas la mort de cellules normales. Plus important encore, le composé il n'a pas d'effets toxiques sur l'animal, peut franchir efficacement la barrière hémato-encéphalique et a des effets bénéfiques sur des modèles précliniques de gliome. Ces résultats suggèrent fortement un potentiel thérapeutique de cet inhibiteur dans la prise en charge du Médulloblastome. Ce nouveau programme a pour objectif d'évaluer son efficacité sur la sensibilisation des cellules souches aux chimiothérapies conventionnelles et sur la progression tumorale du médulloblastome *in situ*. Cette validation *in vivo* est une étape indispensable avant une éventuelle progression vers un essai clinique de phase 1. Dans cette perspective, une lignée cellulaire surexprimant un facteur de transcription clés essentiel pour le maintien de la population cellulaire souche, rendue luminescente sera greffée dans le

cervelet de souris Nude femelles de 3-4 semaines, pour induire un développement tumoral que nous suivrons à l'aide d'un dispositif d'imagerie du petit animal. Ce dispositif permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux sans affecter la quantité de mesure. Une fois le greffon installé, les animaux recevront une injection intra péritonéale de ce composé 3 fois par semaine et l'impact de ce traitement sur la croissance de la tumeur sera suivi par imagerie et comparé à un groupe contrôle qui recevra à la même fréquence une injection de véhicule. Les animaux seront maintenus vivants jusqu'au terme de l'expérience (12 semaines) ou l'apparition du point limite établi selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale. Dans la conception de notre projet nous avons attaché un soin particulier au respect de la règle des 3R en : -Remplaçant autant que possible le recours aux animaux par le développement de tests sur cultures cellulaires ainsi que dans deux modèles tridimensionnels organotypiques substitutifs mimant l'interaction des cellules cancéreuses avec un tissu cérébral sain -Réduisant l'effectif au nombre de sujets strictement nécessaires à l'expérience par la recherche du meilleur compromis entre la grandeur de l'effet recherché et la puissance expérimentale ainsi que par l'utilisation d'un dispositif d'imagerie du petit animal qui assure un suivi longitudinal de la croissance tumorale sans sacrifier d'animal à chaque point de mesure. Seulement 40 animaux seront utilisés. -Raffinant les conditions expérimentales par la mise en œuvre d'une prémédication préopératoire systématique garantissant la prévention de la douleur per et post opératoires ainsi qu'en adaptant la grille d'évaluation du bien-être animal aux spécificités du développement des tumeurs cérébrales. De plus, nous avons déterminé des points limites basés sur des critères biologiques (variation et seuil de bioluminescence corrélés à la croissance tumorale) qui permettent d'anticiper les signes cliniques. Le développement tumoral sera suivi à l'aide d'un dispositif d'imagerie qui permet de réduire sensiblement le nombre d'animaux sans affecter la quantité de mesure. Une fois le greffon installé, les animaux recevront une injection intra péritonéale de LDN-193189 trois fois par semaine. L'impact de ce traitement sur la croissance de la tumeur sera suivi par imagerie. Les animaux seront maintenus vivants jusqu'au terme de l'expérience ou l'apparition du point limite établi selon une grille de score garantissant la prévention de la souffrance animale. En cas de problèmes de santé indépendants du protocole expérimentale et sans dépassement des points limites notre vétérinaire interviendra sur place afin d'évaluer la situation et mettre en place un protocole de diagnostic adéquat. Nos expériences seront suivies par la structure du Bien-être animal et par le vétérinaire référent. Pendant la période de stabulation, les animaux, hébergés en cages avec le matériel de nidification, des buchettes en bois pour ronger, maisonnette, nourriture et eau ad libitum, seront suivis journalièrement par du personnel formé. Pour assurer un maximum de confort et en raison du déficit immunitaire de la souche, les animaux seront hébergés en portoirs ventilés. Ces expériences sont une nouvelle étape du développement préclinique du candidat médicament. De plus, l'étude du mécanisme d'action de ce composé éclairera sur les mécanismes moléculaires de la biogenèse de cette typologie de tumeur, encore très peu connus.

**20219** La thérapie génique a démontré son efficacité pour le traitement de nombreuses maladies rares d'origine génétique telles que les déficits immunitaires, maladies sanguines, oculaires ou neurodégénératives. Le « gène médicament » ou transgène est amené dans les cellules au moyen de transporteurs appelés « vecteurs » qui sont des virus rendus inoffensifs. Toutefois ces vecteurs peuvent déclencher des réponses immunitaires indésirables conduisant à la perte des cellules génétiquement modifiées et compromettant les bénéfices thérapeutiques de ces traitements.

Notre laboratoire a contribué à démontrer chez la souris, les effets délétères des réponses immunitaires contre les médicaments de thérapie génique ou contre les cellules génétiquement modifiées, qui ont ensuite été confirmés chez l'homme. Une simple injection de vecteur de thérapie génique chez la souris ou chez l'homme peut activer le système immunitaire avec la mise en place des mécanismes immunitaires complexes conduisant à une réponse cellulaire et à la production d'anticorps, ainsi qu'à la mise en place d'une mémoire immunitaire qui empêcherait la réadministration du traitement. Pour éviter ces réponses immunes, la plupart des patients traités

par thérapie génique reçoivent maintenant des traitements immunosuppresseurs malgré le risque encouru par les effets secondaires possibles de ces traitements.

Notre laboratoire s'intéresse à contrôler ces problèmes de réponses immunes induits par la thérapie génique de deux manières : en développant des vecteurs de thérapie génique moins immunogènes et en sélectionnant des modalités d'immunosuppression efficaces et le moins toxique possible, permettant de réduire l'inflammation et la prolifération cellulaire liées à la réponse immunitaire. Ce but est particulièrement difficile à atteindre dans le cas de maladies inflammatoires telles que les dystrophies musculaires. Les informations scientifiques obtenues contribueront ainsi à améliorer l'efficacité et la sécurité de la thérapie génique pour les patients.

Pour l'ensemble de notre projet, qui durera 5 ans et compte tenu des paramètres qui seront analysés, nous estimons à 1020 le nombre de souris nécessaires à l'étude.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des « 3R » (Remplacement, Raffinement et Réduction) et du bien-être animal.

Respect de la règle du Remplacement : L'étude des réponses immunitaires à l'échelle de l'organisme entier (rate, ganglions lymphatiques et sang) ne peut pas être réalisée *in vitro*. Des tests en cultures cellulaires donnent des indications sur l'efficacité de transfert de gène, sur la sélectivité cellulaire et sur la toxicité éventuelle des vecteurs mais ne peuvent pas modéliser les interactions complexes et dynamiques qui sont mises en jeu lors des réponses immunitaires adaptatives (production d'anticorps, mémoire immunitaire).

Respect de la règle du Raffinement : Les souris seront hébergées par groupes expérimentaux de 5 dès leur réception. La non redistribution ultérieure des animaux limite leur stress. Les animaux seront manipulés le moins possible afin de réduire leur angoisse et leur stress. Lors des prélèvements sanguins, les animaux seront sous anesthésie générale. Des enrichissements environnementaux et du milieu seront ajoutés dans les cages (e.g. abris, nourriture adaptée aux rongeurs).

Respect de la règle de la Réduction : Un suivi longitudinal sera réalisé pour minimiser le nombre d'animaux à étudier, et le nombre d'animaux utilisés, d'un total de 1020, a été calculé statistiquement de manière à pouvoir tirer des conclusions.

**20220** Ce projet de recherche translationnelle a pour objectif de mettre en place un traitement pour des maladies du stockage du glycogène (appelées GSD). Dans ce projet, nous allons travailler sur deux de ces maladies : la maladie de Pompe (GSD de type II) et de Cori (GSD de type III), qui sont des maladies génétiques rares pour lesquels il n'existe pas encore de traitement efficace. L'anomalie génétique des GSD entraîne chez ces malades un dérèglement métabolique et une accumulation anormale d'une forme de réserve énergétique de l'organisme : le glycogène. Cette accumulation toxique provoque des problèmes cardiaques, respiratoires et musculaires chez les patients.

Les travaux réalisés dans ce projet ont pour but d'inactiver le gène *Gys1*, responsable de la formation du glycogène dans les muscles. Pour ce faire, nous allons utiliser un vecteur viral adéno associé (AAV) modifié qui est un virus à ADN modifié pour permettre de transporter les éléments jusqu'aux cellules pour permettre l'inactivation du gène *Gys1*. Ces études permettront l'évaluation des AAV destinés à rendre silencieux le gène *Gys1* dans des modèles murins sains et atteints de la maladie de Pompe ou de Cori (souris génétiquement modifiées). Cette stratégie ne vise pas à réduire la totalité du glycogène stocké mais seulement une grande majorité afin de laisser une source d'énergie aux souris. Si toute fois notre stratégie s'avère trop efficace, le foie est un organe qui n'est pas touché par notre approche (régulé par *Gys2*) et qui est la source principale d'énergie de l'organisme. De plus, la glycémie des souris sera contrôlée régulièrement.

Les études sur les souris saines permettront de confirmer nos données obtenues *in vitro* et de sélectionner les candidats efficaces avant l'utilisation de souris malades.

L'organisme est entraîné à lutter naturellement contre les AAV et ce mécanisme de défense est aujourd'hui impossible à recréer en laboratoire. L'utilisation de méthodes comme la prédiction information ou l'utilisation de cellules en culture (humaines ou animales) nous ont permis de

selectionner et d'optimiser nos AAV candidats (remplacement), mais aujourd'hui il n'existe aucune méthode substitutive capable d'apporter les réponses quant à leur efficacité. Le recours à l'animal est donc incontournable. Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet est de 366 souris, calculé par approche statistique, est le nombre minimum nécessaire pour obtenir des résultats scientifiquement et statistiquement fiables. Nous allons tout faire pour limiter le nombre d'animaux utilisé (réduction), pour les injections par voie intramusculaire (IM), nous réduirons le nombre d'animaux en n'utilisant pas de groupe contrôle (par souris, nous récupérerons les deux muscles gastrocnémiens, le non injecté servira comme contrôle négatif et l'injecté pour suivre la fonctionnalité de notre approche). Pour les injections par voie intraveineuse (IV), nous réduirons le nombre de souris en limitant l'utilisation de souris contrôle (un seul groupe contrôle pour la colonie Gaa<sup>-/-</sup> et Agl<sup>-/-</sup>). De plus, si lors des premières procédures, nos stratégies se montrent inefficaces (problème lors de l'élaboration des gRNA ou des miR), nous ne passerons pas aux procédures suivantes.

Dans un premier temps, les AAV seront administrés par voie IM à des animaux adultes anesthésiés sains puis malade, ce qui nous permettra de valider l'efficacité de nos vecteurs dans un modèle de souris WT afin de limiter l'utilisation de souris dommageable (raffinement). Après sélection des AAV efficaces localement, ils seront administrés par voie IV, afin d'évaluer leur efficacité sur l'ensemble de l'organisme. Leur potentiel de « guérison » sera évalué chez des souris malades adultes (stade avancé de la maladie) et celui de « prévention » chez des souris malades nouveau-nés (stade précoce de la maladie). Aucun effet indésirable n'est attendu suite aux injections, cependant les animaux seront surveillés de près pendant les premières heures et des mesures favorisant leur récupération seront mises en place (hydratation, réchauffement). Nous allons également tout mettre en œuvre pour le bien-être des animaux (limitation du nombre de souris par cage, enrichissement des cages, limitation du stress lors de la manipulation des animaux, etc.) (raffinement).

Les études dureront 6 semaines (suite aux injections IM) ou 4 mois (suite aux injections IV), au cours desquels un prélèvement sanguin mensuel sera réalisé, ne provoquant qu'un inconfort passager chez l'animal. L'ensemble des actes réalisés (injections, prélèvements) ne nécessitera qu'une contention légère de l'animal. A la fin des études IV, une évaluation de la force musculaire sera réalisée (acte non douloureux) les souris seront euthanasiées après anesthésie profonde. Nous récupérerons alors certains organes comme les muscles, le cœur et le foie pour mesurer l'efficacité de nos stratégies.

**Remplacement :** La première étape de sélection des gRNA ou des miR aura été réalisée sur des lignées de cellules afin de limiter l'utilisation de souris.

**Réduction :** Pour les IM, nous réduirons le nombre d'animaux en n'utilisant pas de groupe contrôle (par souris, nous récupérerons les deux muscles gastrocnémiens, le non injecté servira comme contrôle négatif et l'injecté pour suivre la fonctionnalité de notre approche). Pour les IV, nous réduirons le nombre de souris en limitant l'utilisation de souris contrôle (un seul groupe contrôle pour la colonie Gaa<sup>-/-</sup> et Agl<sup>-/-</sup>). De plus, si lors des premières procédures, notre stratégie se montre inefficace (problème lors de l'élaboration des gRNA ou des miR), nous ne passerons pas aux procédures suivantes.

**Raffinement :** les injections dans le muscle gastrocnémien seront réalisées sur des animaux préalablement anesthésiés par injection intra-péritonéale. L'anesthésie de l'animal sera vérifiée après pincement de la base de la queue. Une fois l'animal endormi, l'injection sera réalisée en piquant la base du muscle avec une aiguille de petit diamètre. L'animal sera replacé dans sa cage, ensuite la cage sera placée sur une plaque chauffante en attendant son réveil. Les injections intraveineuses dans la veine caudale seront réalisées après avoir favorisé la dilatation des veines pour un maximum d'efficacité et de rapidité d'intervention sur l'animal. Les prélèvements sanguins seront réalisés au niveau de la veine sous-maxillaire sur souris vigile afin de limiter la manipulation des souris. Une fois le prélèvement terminé, on appliquera une compresse au niveau du point de prélèvement afin de stopper l'éventuel saignement.

Les souris juvéniles seront manipulées le moins possible afin de limiter le rejet par leur mère. Après injection dans la veine temporale, les souriceaux seront immédiatement replacés avec leur mère. Les petits resteront avec leur mère jusqu'à sevrage complet.

Le principal bénéfice attendu de ces études est l'obtention de données concluantes sur l'efficacité de cette approche thérapeutique chez les souris malades, données indispensables pour un futur développement clinique.

**20221** Les animaux de compagnie (essentiellement chat et chien) sont élevés et maintenus à domicile dans une relation avec leurs propriétaires qui se doit d'être harmonieuse et de garantir leur bien-être. Malgré la volonté des propriétaires de garantir le bien-être de leurs animaux de compagnie, certaines situations peuvent se révéler source de stress, d'anxiété et de mal-être pour ces animaux. La réponse face à de telles situations peut passer par des stratégies éducatives tant de l'animal que de son propriétaire souvent sous l'égide de personnes compétentes dans la gestion de la relation animal-homme mais aussi par le recours à des actes thérapeutiques basés sur l'utilisation de produits pharmacologiques souvent source d'effets secondaires et mal adaptés à la prise en charge de ces animaux. Le recours à des aliments contenant des produits ayant des vertus au plan de l'anxiété et du stress peut permettre de faciliter la prise en charge du mal-être de l'animal de manière simple et plus aisée puisque basée sur l'alimentation de ces animaux. Le but du présent travail est d'étudier chez le rat adulte les effets de l'administration quotidienne pendant 14 jours de 2 produits servant de base à la production de compléments alimentaires destinés aux animaux de compagnie nommés A et B ainsi que du mélange des deux dénommé M sur le niveau d'anxiété et d'activité de rats mesurés dans 3 tests comportementaux : l'open-field, le labyrinthe en croix surélevée et le test résident-intrus. La totalité du projet nécessitera 144 rats mâles adultes provenant tous du même fournisseur répartis en 4 groupes de 12 rats chacun sélectionnés à partir d'un lot initial de 60 animaux tous testés pour leur niveau initial d'anxiété dans la boîte claire-obscur de manière à limiter la variabilité de la réponse anxieuse des animaux retenus pour la suite du projet (les 12 animaux présentant des réponses anxieuses les plus extrêmes que ce soit en terme d'augmentation ou de baisse seront ainsi écartés). Chacun de ces 4 lots sera ensuite administré quotidiennement avec le produit qui lui est dédié (véhicule, produit A, produit B, mélange M des 2 produits en proportions équivalentes) par gavage à raison d'un volume de 0,5 mL par 100g de poids corporel pendant 14 jours. Le véhicule utilisé pour mettre en solution les produits à tester et qui sera administré aux animaux du groupe contrôle sera la méthylcellulose, produit couramment utilisé en tant qu'épaississant et émulsifiant qui ne présente pas d'activité pharmacologique ni de toxicité. Les 48 animaux seront alors tous testés dans 3 tests successifs, l'open-field, le labyrinthe en croix surélevée et le test résident-intrus. Ces différents tests sont bien connus pour explorer les niveaux d'activité et d'anxiété des animaux ainsi que leur comportement social (résident-intrus). Des lots additionnels seront utilisés au moment de ces différents tests : un lot de 12 rats recevant une administration aiguë de diazepam (Valium) à la dose de 3 mg/kg pour les 2 tests de l'open-field et du labyrinthe en croix surélevée de façon à avoir un témoin positif permettant de valider le bon déroulement de ces 2 tests, un 2e lot additionnel de 12 rats qui sera utilisé lors du test résident-intrus recevra une administration quotidienne de diazepam (Valium) à la dose de 3 mg/kg/jour pendant 4 jours pour avoir un témoin positif permettant de valider le bon déroulement du test. La répétition de l'administration de diazepam vise à habituer les animaux aux effets de cette molécule et éviter le biais des effets indésirables qu'elle induit en début de traitement sur le comportement social des animaux la recevant. Pour ce test, un lot de 60 rats ne recevant pas de traitement sera utilisé comme intrus pour tester le comportement social des animaux objets de l'étude. Les résultats seront analysés selon une procédure statistique appropriée en fonction d'une seule source de variation qui est le traitement reçu par chaque lot. Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but du projet étant de tester l'impact de la consommation de produits pouvant rentrer dans la composition d'aliments pour des animaux de compagnie sur l'expression des niveaux d'activité et d'anxiété du rat (Remplacement). Le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 144 rats qui seront organisés et utilisés en lots expérimentaux comme décrits ci-dessus dans le but de limiter le nombre de rats utilisés (Réduction) tout en assurant la pertinence des résultats qui seront obtenus (Raffinement). Les rats seront maintenus dans des conditions d'hébergement standardisées dans des portoirs ventilés telles que prescrites dans la réglementation

et répondant aux critères établis dans le cadre du fonctionnement de l'EU lieu de l'expérimentation (l'enrichissement sera assuré par la présence de feuilles de papier absorbant). Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel certifié et formé (Raffinement). L'administration par gavage des produits sera assurée par du personnel certifié, formé et entraîné à ce type de manipulation. (Raffinement) Les points limites mentionnés dans la saisine relatifs à un état de mal-être persistant seront relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents), tout signe de lésion suite à l'administration des substances pharmacologiques utilisées lors des tests (saignement, difficulté respiratoire et/ou cardiaque, signes de fausse route), signes de comportements anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères). Les rats engagés dans ce projet seront conservés et pourront être utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du personnel de l'EU et de sa structure en charge du bien-être animal, complété par l'avis du vétérinaire référent. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours.

**20222** L'arthrose est la maladie articulaire la plus répandue. Actuellement en France, 10 millions de personnes souffrent de cette pathologie. L'arthrose est une maladie complexe et sévère qui altère fortement la qualité de vie des patients. L'âge, le sexe, l'obésité, et l'alimentation sont des facteurs de risque de cette maladie qui sont également associés à l'altération du microbiote intestinal. Elle se caractérise par une destruction du cartilage qui s'étend à toutes les structures de l'articulation, notamment à l'os et au tissu synovial. A ce jour, il n'existe que des traitements symptomatiques de l'arthrose qui visent à soulager la douleur. A long terme, l'unique solution est la pose d'une prothèse articulaire soulageant le malade sur une période de 15 à 20 ans. Face aux douleurs liées à l'arthrose, de plus en plus de patients consomment ou sont tentés de consommer soit du cannabis ou des cannabinoïdes. Plusieurs études cliniques sont en cours concernant la consommation de cannabinoïdes dans les douleurs liées à l'arthrose notamment au Canada et aux Etats-Unis dont l'objectif est d'évaluer les effets antalgiques des cannabinoïdes utilisés par des patients arthrosiques. Par contre, malgré le nombre important de produits qui apparaissent sur le marché avec différentes voies d'administration, leur potentiel d'efficacité sur le cartilage n'est pas encore évalué.

Seules des études *in vitro* ont montré que le système endocannabinoïde est capable de jouer un rôle dans l'arthrose et que les récepteurs aux endocannabinoïdes sont exprimés au sein de l'articulation (cartilage ou synoviale). L'expression importante des récepteurs aux cannabinoïdes dans les chondrocytes, seul type cellulaire présent dans le cartilage, suggère que ces derniers seraient à même de répondre aux cannabinoïdes. D'autres études *in vitro* ont également montré que l'activation de ces récepteurs diminuait la senescence des chondrocytes, et diminuait l'activité des enzymes responsables de la dégradation du cartilage.

Dans une nécessité d'améliorer les données *in vivo* sur le rôle des cannabinoïdes dans l'arthrose et leur potentiel utilisation dans le traitement de l'arthrose, nous souhaitons donc étudier l'intérêt d'un cannabinoïde sur les lésions du cartilage observées au cours de l'arthrose chez le rat. Cette étude sur l'efficacité d'un tel produit dans l'arthrose ne peut se faire que dans le cadre de modèles *in vivo* (Remplacement). Pour l'exploration de cette nouvelle piste thérapeutique, nous souhaitons injecter directement un cannabinoïde dans l'articulation afin de cibler les lésions articulaires et de limiter par ailleurs la diffusion dans l'organisme, chez des rats ayant subi une section du ligament croisé antérieur. La section du ligament croisé antérieur chez le rat est un modèle d'arthrose expérimentale très utilisé, puisqu'il présente les mêmes signes cliniques que ceux observés dans l'arthrose humaine. L'expérimentation en milieu conventionnel est essentielle puisque l'importance du microbiote intestinal est soulignée expérimentalement et cliniquement lors des rhumatismes inflammatoires et/ou dégénératifs. En effet, l'environnement microbien est particulièrement susceptible d'être impliqué dans le développement de maladies inflammatoires et travailler sur un modèle d'arthrose ou d'arthrite expérimentales en milieu stérile ne reproduirait absolument pas la «

vraie-vie » et il est donc essentiel de conserver l'interaction gène-environnement et de rester en milieu conventionnel.

Les paramètres évalués seront donc 1) les lésions du cartilage et le degré d'inflammation de la membrane synoviale 2) l'expression des différents récepteurs aux cannabinoïdes dans le cartilage. La dose utilisée est celle réputée comme antalgique dans les modèles expérimentaux d'arthrose.

Pour cela, 28 rats mâles Wistar sains seront utilisés dans ce projet et séparés en 4 groupes :

Groupe 1 (7 rats) : Les rats subiront une arthrotomie (ouverture chirurgicale de l'articulation et fermeture) sur le genou droit suivie d'une injection intra-articulaire d'excipient à 3, 7, 14 et 21 jours après l'opération.

Groupe 2 (7 rats) : Les rats subiront une arthrotomie (ouverture chirurgicale de l'articulation et fermeture) sur le genou droit suivie d'une injection intra-articulaire du cannabinoïde à 3, 7, 14 et 21 jours après l'opération.

Groupe 3 (7 rats) : Les rats subiront une arthrotomie et une section du ligament croisé antérieur sur le genou droit pour induire l'arthrose expérimentale suivie d'une injection intra-articulaire de l'excipient à 3, 7, 14 et 21 jours après l'opération.

Groupe 4 (7 rats) : Les rats subiront une arthrotomie et la section du ligament croisé antérieur sur le genou droit pour induire l'arthrose expérimentale suivie d'une injection intra-articulaire du cannabinoïde à 3, 7, 14 et 21 jours après l'opération.

Deux procédures seront réalisées : 1) Section du ligament croisé antérieur à J0 ; 2) Injections intra-articulaires du cannabinoïde à J3, J7, J14 et J21 ;

Tous les animaux seront mis à mort selon la méthode réglementaire par dislocation cervicale sous anesthésie générale au bout de 28 jours. Le tissu synovial, le liquide synovial et les deux genoux seront prélevés sur les animaux morts afin de réaliser les études histologiques et immunohistologiques pour évaluer l'état des tissus articulaires (membrane synoviale et cartilage).

Nous surveillerons quotidiennement les animaux. Si des anomalies du comportement (vocalisation, pilo-érection, cachexie) des troubles du mouvement pouvant traduire une neurotoxicité, et/ou une perte pondérale supérieure à 20% après injection du cannabinoïde étaient observés, les animaux concernés seraient mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques. L'apparition éventuelle d'une infection au niveau de la cicatrice et/ou du site d'administration nous obligerait également à mettre à mort l'animal.

Dans un souci éthique, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum, soit n=7 rats/groupe. Ce nombre est suffisant pour les études statistiques (Réduction). Pour réduire également le nombre de rats, le genou gauche est laissé sain et est utilisé comme contrôle latéral. L'intervention chirurgicale et les injections sont réalisées sous anesthésie gazeuse générale (Raffinement).

**20223** L'obésité, présente dans l'ensemble des pays industrialisés, constitue un problème de santé majeur. Elle est considérée comme une maladie métabolique chronique qui se caractérise par un excès de poids ayant des conséquences défavorables sur le bien-être physique et psychologique des individus. En France, 8 millions de personnes sont atteintes d'obésité et leur prise en charge coûte plus de 3 milliards d'euros en soins à l'assurance maladie. C'est un facteur de risque pour des pathologies chroniques, telles que le diabète, les maladies cardio-vasculaires et respiratoires, mais aussi de comorbidité. On estime qu'en Europe, l'obésité est responsable de 10% à 13% des décès.

Maladie invalidante aux multiples causes, l'obésité est associée à une inflammation chronique. En effet, les cellules du système immunitaire sont très dépendantes de leur environnement et utilisent des voies métaboliques distinctes (comme la glycolyse et l'oxydation des acides gras) pour assurer différentes fonctions. Ainsi, un déséquilibre dans le statut métabolique de l'organisme provoque des réponses inflammatoires inappropriées qui ont pour conséquences d'aggraver la situation dans un cercle vicieux.

Le facteur nucléaire PPAR- $\gamma$ , gène clé du métabolisme cellulaire, fut initialement décrit comme portant une fonction unique : celle de la génération de cellules graisseuses (adipocytes) saines. En effet, les souris génétiquement dépourvues du facteurs PPAR- $\gamma$  ne possèdent pas de tissus adipeux et sont diabétiques. De récents travaux ont démontré un nouveau rôle de PPAR- $\gamma$  dans le control de la réponse inflammatoire. Ainsi l'activation de PPAR- $\gamma$  favorise le développement de lymphocytes T régulateurs (anti-inflammatoires) et inhibe les lymphocytes Th17 de type 3 (exprimant le facteur ROR $\gamma$ t), pro-inflammatoires. Ces résultats nous ont conduit à nous interroger sur le rôle de PPAR- $\gamma$  dans le compartiment immunitaire ROR $\gamma$ t dans un contexte d'obésité. Nous avons généré des souris déficientes pour PPAR $\gamma$  dans ce compartiment (saisine précédemment déposée et acceptée). Ces souris ne présentent pas de phénotype dommageable, mais semble être protégées de l'obésité qui survient avec l'âge chez la souris C57BL6. Afin de confirmer ces observations et d'explorer le rôle potentiel joué par PPAR- $\gamma$  dans l'obésité, nous proposons de soumettre ces souris à un régime riche en lipides et en glucides (régime HFD, High Fat Diet).

Notre étude utilisera des souris transgéniques dépourvues du facteur PPAR- $\gamma$  uniquement dans les cellules ROR $\gamma$ t, et des souris normales non transgéniques issues du même croisement (sauvages), (n=8 par groupe). L'obésité sera provoquée en soumettant les animaux au régime HFD pour une durée maximale de 22 semaines. Des souris sous un régime normal (équilibré) seront utilisées comme contrôles. La prise de poids sera mesurée de façon hebdomadaire et les prélèvements sanguins, les mesures de la température corporelle, de la prise alimentaire ainsi que la réponse à des tests métaboliques de tolérance au glucose (GTT) au pyruvate (PTT) et à l'insuline (ITT) (essentiels à la caractérisation de la maladie et le suivi des animaux) seront réalisés. Le test GTT est réalisé 4 fois, de manière à suivre l'installation de l'insulinorésistance à différents temps: 4, 8, 12 et 18 semaines post-régime. En fin de protocole, les différentes procédures sont décalées d'une semaine (7jours) afin de permettre la récupération du volume sanguin et de limiter toute influence croisée d'une procédure sur l'autre. Les tests PTT (à 19 semaines) et ITT (à 20 semaines) ne seront réalisés qu'une seule fois à la fin du protocole expérimental. L'état général de l'animal (absence de toilette, pelage hérissé, regard et prostration) sera analysé pour déterminer la présence des signes de douleur afin de prendre les mesures adéquates et de garantir le bien-être animal.

Un nombre de 128 animaux sera nécessaire pour répondre à notre hypothèse de travail. A la fin du projet, (22 semaines post-régime) les animaux seront mis à mort de façon réglementaire afin de prélever leurs organes. La moitié de ces animaux sont destinés aux analyses histologiques, d'expression de gènes et de protéines. L'autre moitié des animaux sera dédiée à l'analyse par marquage d'anticorps fluorescents ciblant les différentes populations immunitaires des tissus graisseux (viscéraux et sub-cutanées), du foie, de la rate et des ganglions sub-cutanées et mésentériques). L'utilisation de 8 animaux par groupe et leur suivi longitudinal sera nécessaire et suffisant (Réduction) pour obtenir des résultats statistiquement robustes répondant à la question posée.

Le remplacement n'est pas envisageable pour cette étude qui vise à comprendre le rôle de récepteurs nucléaires exprimés par des cellules immunitaires sur le tissu adipeux. En effet, aucun modèle ne permet de reproduire les interactions complexes entre le système immunitaire et le tissu adipeux au cours de l'obésité.

Les souris sont placées par 4 à 5 animaux par cage moyenne (17x31x16cm, 530cm<sup>2</sup>) avec un enrichissement constitué d'une feuille de cellulose et d'un tunnel en polycarbonate (Raffinement). La température des pièces est régulée à 22 $\pm$ 2 °C et l'hygrométrie est de 50 $\pm$ 25%.

Ce projet a pour objectif de mieux comprendre l'origine et le déroulement de l'obésité, de transposer cette compréhension à l'Homme (et à d'autres maladies inflammatoires chroniques) dans le but de développer des stratégies de prévention et de thérapies.

**20224** La survenue brutale et imprévue d'un arrêt cardiaque est un enjeu majeur de santé publique, à l'origine d'environ 40 000 décès chaque année en France. Bien que des avancées aient été faites ces dernières années afin d'améliorer la réanimation des patients, la mortalité reste considérable et seulement 5% des patients survivent avec une bonne récupération neurologique. Afin d'améliorer



ce pronostic, notre laboratoire a développé une stratégie innovante qui consiste à induire une hypothermie ultra-rapide par la ventilation liquide totale hypothermisante des poumons après l'arrêt cardiaque. Expérimentalement, cette méthode est capable d'induire de puissants bénéfices neurologiques et cardiaques, par rapport aux méthodes traditionnelles de refroidissement.

L'objectif de ce projet est de comprendre l'effet de la ventilation liquide hypothermisante sur la réponse neuro-inflammatoire dans un modèle d'arrêt cardiaque chez le porc. Pour cela, nous évaluerons les mécanismes inflammatoires en instaurant la ventilation liquide à différents moments après la réanimation et en comparant avec un agent pharmacologique qui bloque directement l'activité des cellules inflammatoires. Cela permettra d'évaluer si ce blocage est suffisant pour produire des bénéfices neurologiques aussi puissants que ceux de l'hypothermie. Les expériences seront conduites sur des animaux profondément anesthésiés et exposés à un antalgique puissant tout au long de la procédure. L'évaluation neurologique des animaux sera évaluée afin d'apprécier les éventuelles bénéfices de l'agent pharmacologique au décours d'un arrêt cardiaque.

Compte tenu de la complexité de l'affection considérée, 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 120 animaux. L'ensemble des expériences sera réalisé à l'état anesthésié, pour prévenir toute souffrance de l'animal (Raffinement). Les animaux seront hébergés dans des boxes individuels avec des copeaux de bois au sol et avec un enrichissement du milieu (jouets en plastique, etc). Ce travail se justifie par les applications envisagées chez l'homme et le bénéfice possible chez les patients réanimés après un arrêt cardiaque.

**20225** La dystrophie musculaire des ceintures (aussi appelée LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophy) englobe un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires rares qui toucheraient environ 5-6 personnes par million. Ce sont des maladies génétiques dont plus de trente gènes ont été identifiés à ce jour. À chaque gène correspond une forme distincte de myopathie des ceintures. Ces différents types des myopathies des ceintures affectent essentiellement les muscles situés autour de la région scapulaire (épaules) et de la région pelvienne (les hanches). Elles se manifestent par une diminution lente de la force des muscles qui peut conduire à une perte de la marche, et quelquefois par une atteinte respiratoire et/ou du muscle cardiaque. Jusqu'à maintenant la prise en charge médicale vise essentiellement à prévenir les complications. Des pistes de traitement possibles s'orientent vers la thérapie génique utilisant des vecteurs viraux adéno-associés recombinants (rAAV). Ces vecteurs non pathogènes sont des vecteurs de choix pour le traitement de maladies génétiques car ils assurent un transfert de gènes thérapeutiques sûr et efficace dans différents tissus.

Dans la perspective de réaliser des essais cliniques en vue de la validation de stratégies de thérapie génique, il est indispensable de pouvoir confirmer la dose thérapeutique et de déterminer la biodistribution de ces vecteurs dans une espèce la plus proche possible de l'homme.

Dans ce projet, nous nous attacherons plus particulièrement à tester deux produits qui visent chacun à remplacer un gène différent responsable de myopathie des ceintures. Un des vecteurs étant basé sur un nouveau sérotype hybride AAVg, il est aussi prévu de tester un mélange de vecteurs AAV9 et AAVg contenant le même gène rapporteur, afin de déterminer le taux de AAVg dans les tissus d'intérêt (muscle squelettique) et potentiellement dans les tissus non ciblés (notamment le foie, le coeur).

Les objectifs sont donc de :

-Confirmer la dose thérapeutique des 2 vecteurs chez le primate non-humain (PNH) en testant deux doses sélectionnées grâce aux études réalisées chez le rongeur.

-Comparer la biodistribution du vecteur AAVg par rapport au vecteur AAV9 avec un même gène rapporteur.

Ce projet prévoit d'inclure 17 macaques fascicularis séronégatifs pour les vecteurs rAAV considérés. Les animaux recevront, sous anesthésie, une administration par voie intraveineuse (IV), des vecteurs thérapeutiques ou le véhicule (excipient sans particule virale), puis seront suivis 45±4

jours post-injection. Les animaux seront répartis en 6 groupes, à raison de 2 (groupe 1 contrôle) ou 3 primates par groupe (groupes 2-6). Les vecteurs AAV (groupes 2-3) et AAVg (groupes 4-5) seront injectés à 2 doses différentes, et le mélange AAVg + AAV9 avec même rapporteur (groupe 6) à une seule dose.

Tout au long du suivi, des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie en pré-injection puis en post-injection à différents time-points pour permettre un suivi des paramètres hématologiques, biochimiques et hémostasie, des dosages de marqueurs cardiaques, et contrôle du statut sérologique vis à vis des AAV.

Différents examens seront réalisés afin d'en évaluer l'effet sur les fonctions cardiaques (Electrocardiogramme (ECG), échocardiographie).

Après sacrifice, selon les groupes et vecteurs considérés, les prélèvements post-mortem permettront soit de confirmer la dose efficace des 2 vecteurs considérés, soit d'évaluer la biodistribution du vecteur AAVg en comparaison à la biodistribution du vecteur AAV9.

En outre, afin de documenter la réponse immunitaire les splénocytes seront isolés à partir de la rate de tous les primates inclus.

Règle des 3R :

1) Remplacer : les études réalisées chez le singe apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes de toxicité, d'efficacité et d'immunogénicité de l'AAV. La complexité des réactions en jeu ne permet pas le recours à des méthodes substitutives, telles que les études *in vitro* isolées et justifie notre recours à des animaux.

2) Réduire :

Au cours de cette étude chez le primate, le nombre d'animaux (n=3 /groupe) utilisé est réduit à son minimum pour une exploitation possible des résultats. Cette répartition est basée sur notre expérience, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure et de répondre aux questions posées par comparaison des différents groupes, savoir la confirmation de dose pour les groupes 2 à 5 et la biodistribution pour le groupe 6.

3) Raffiner :

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement (techniciens animaliers et vétérinaire). Des protocoles anesthésiques seront mis en place selon la procédure à réaliser. Les administrations expérimentales (injection intraveineuse des vecteurs thérapeutiques) se dérouleront sous anesthésie générale profonde. Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min.). L'évaluation de la fonction cardiaque (ECG et échocardiographies) sera réalisée sous anesthésie avant injection (Baseline) et en fin de protocole. Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces procédures.

Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés en cage en post-injection, et en volières en groupes dès que possible pour favoriser les déplacements verticaux.

Les animaux seront intégrés dans le programme d'enrichissement du Centre regroupant un certain nombre d'activités : plates-formes, étagères, perchoirs, cordes...), jouets (balles, Kongs®, miroirs, anneaux, tasseaux en bois...), alimentation diversifiée pour encourager la recherche de nourriture, socialisation avec l'Homme, programme de télévision (visionnage de films ou autres documentaires animaliers) et de musique.

**20226** La douleur est un problème de santé publique très important. Les douleurs chroniques, qu'elles soient neuropathiques ou inflammatoires, touchent plus de 5 millions de personnes en France et sont persistantes et rebelles aux traitements usuels. La prise en charge de ces douleurs constitue une priorité de santé publique mais reste difficile.

Le projet consiste à tester l'efficacité d'une molécule médicament que nous venons de développer pour traiter différents types de douleur chronique. Une formulation chimique basique de notre molécule médicament a déjà démontré son efficacité pour le traitement des douleurs chroniques dans une étude *in vitro* et *in vivo* préalable. Aujourd'hui nous souhaitons tester *in vivo* une formulation chimique plus complexe qui apporte une grande stabilité au médicament et qui sera transposable pour un traitement chez le patient humain. L'objectif sera de déterminer la dose et la fréquence optimales du traitement.

Des injections de la molécule médicament seront effectuées sur 3 types de modèle de douleur chronique : douleurs neuropathiques, douleurs inflammatoires et douleurs consécutives à une chimiothérapie.

Ces modèles seront appliqués sur des rats sauvages et deux types d'injection seront testés : en intrathécal et en sous-cutané.

La sensibilité des animaux sera évaluée à l'aide d'outils classiques pour mesurer la sensibilité mécanique afin de suivre l'efficacité du traitement.

Il est prévu d'utiliser 576 rats pour ce projet.

Les groupes testés seront des animaux sauvages en condition contrôle, de douleur neuropathique, de douleur inflammatoire et de douleur consécutive à une chimiothérapie.

Afin de respecter la règle des 3R :

- Remplacer : 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. 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 cible du traitement. Nous sommes en train de développer un modèle *in vitro* de cellules souches humaines différenciées en neurones pour mieux comprendre le fonctionnement de notre gène cible 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.

- Réduire : le nombre de rats utilisé 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. Le nombre d'animaux par lot est basé sur la littérature où un effet statistiquement significatif est mis en évidence à partir d'un seuil de 6 animaux par lot. L'étude nécessitant de nombreuses cohortes associées au fait que notre étude précédente avec cette molécule médicament donnait des résultats très homogènes dans un même lot, nous avons choisi de constituer des lots de 6 animaux pour réduire au maximum le nombre d'animaux et respecter la règle des 3R.

- Raffiner : pour limiter l'angoisse due aux tests pratiqués, une acclimatation est réalisée durant laquelle les animaux à leur arrivée sont laissés 5 jours dans les cages pour qu'ils s'habituent aux locaux de notre animalerie. Durant une semaine, les animaux sont ensuite manipulés et présentés aux appareils de tests comportementaux pour évaluer la sensibilité mécanique mais aucun test n'est pratiqué afin que les animaux s'habituent à l'expérimentateur ainsi qu'aux différents équipements de test. Cette étape d'habituance permet aux animaux de s'habituer à l'environnement, à l'expérimentateur et de limiter le stress lié à la procédure.

Ce projet porte sur la douleur, par conséquent, l'utilisation des médicaments anti-douleur suite à l'établissement du modèle de douleur est proscrite. Cependant, le temps d'expérimentation est réduit au strict nécessaire afin de limiter la souffrance des animaux dans le temps.

Les animaux seront anesthésiés par anesthésie gazeuse à l'isoflurane (induction 4-5%, maintien 1,5-2%) pendant la chirurgie et les injections. Ils seront réchauffés par une lampe rouge pendant la phase de réveil puis ils seront regroupés et isolés des animaux non opérés ou non injectés afin de limiter les combats. Une surveillance post-opératoire et post-injection sera assurée par l'expérimentateur et les zootechniciens. Les animaux seront ensuite observés quotidiennement au cours de l'expérimentation et nous utiliserons une grille de score d'évaluation de la douleur et/ou souffrance pour évaluer l'état général et la douleur des animaux. Différents paramètres sont observés tels que l'apparence, l'alimentation, le comportement naturel et la respiration.

La douleur étant le paramètre étudié aucune médication antalgique ou analgésique systématique ne sera appliquée. Si la douleur s'avère trop intense et donc les points limites atteints (perte de poids >20%, vocalisations spontanées, automutilation, animal agité ou immobile et détresse respiratoire, saccadée) les animaux sont euthanasiés (Euthasol VET, pentobarbital sodique à 400mg/ml; 1 ml/kg pour les rats injectés en intrapéritonéal) sans délai afin d'éviter la mort par inanition.

En cas de blessures dues à des combats entre les animaux, ceux-ci seront séparés et les plaies désinfectées et soignées.

Les animaux seront hébergés en milieu enrichi (social et environnemental) afin de respecter au mieux leur confort et leur niveau de stress. Ce milieu est constitué d'un tunnel cylindrique pour procurer un sentiment de sécurité à l'animal, du coton pour la nidation, du papier cartonné pour stimuler les instincts naturels de nidification et de jeu et des copeaux de pin pour réchauffer les rats en cas d'hypothermie.

**20227** En France, la formation des médecins - et plus particulièrement des chirurgiens - repose en grande partie sur le compagnonnage au chevet du patient avec le système de l'internat. Toutefois, en termes de sécurité du patient, certains gestes nécessitent à être pratiqués par les jeunes praticiens sur des modèles inertes (simulateurs, cadavres, ...) mais aussi sur des modèles animaux qui demeurent irremplaçables pour se familiariser avec le stress, les événements inattendus ou indésirables rencontrés au bloc opératoire. Le décret 2011-2116 a introduit l'obligation de formation continue pour les médecins en exercice et, pour les mêmes raisons, le recours à l'animal vivant demeure irremplaçable dans de nombreux cas.

Le présent projet concerne la partie pratique de la formation des chirurgiens sur des animaux permettant d'enseigner à des chirurgiens reconnus comme spécialistes par l'ordre des médecins, des internes en chirurgie en cours de formation chirurgicale. La partie pratique consiste à apprendre à réaliser sur des rats des connexions de plusieurs vaisseaux sanguins (anastomoses), des transplantations d'organes (reins) et des lambeaux microchirurgicaux. Ces procédures peuvent en partie être simulée sur des modèles inertes. En revanche pour atteindre un niveau de compétence permettant de les réaliser sur des patients le recours à l'animal vivant demeure indispensable (étanchéité des sutures, complexité des parois vasculaires, réactions neurovégétatives ne sont pas à ce jour reproduites par les modèles synthétiques).

La formation visera des groupes constitués de 8 stagiaires et durera 10 jours. Chaque stagiaire utilisera un animal par demi journée soit 20 animaux. Nous envisageons de réaliser cette formation à un rythme de deux fois par an et le projet utilisera donc au maximum 1600 animaux au total. Chaque animal peut subir plusieurs procédures.

Il s'agit d'une procédure sans réveil. Avant leur utilisation à des fins professionnelles, les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi par divers objets attractifs pour cette espèce. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane par inhalation 4% au moment de l'induction et 2-2,5% pour le maintien de l'anesthésie) avec administration d'un analgésique (buprénorphine). Le but c'est d'apprendre à réaliser des anastomoses vasculaires microchirurgicales dont l'excellence de leur efficacité sera validée par un test de perméabilité vasculaire de l'anastomose sans besoin de réveiller l'animal.

**20228** Le but du Diplôme d'université de microchirurgie est l'apprentissage de la suture vasculaire sous microscope opératoire chez le rat. Cet apprentissage est indispensable à de nombreuses spécialités chirurgicales travaillant sous microscope opératoire pour maîtriser des gestes uniquement réalisables sous microscope. Cette gestuelle est nécessaire en orthopédie comme par exemple pour la chirurgie de la main, en neurochirurgie, en ophtalmologie, en chirurgie plastique pour la suture vasculaire des lambeaux, en chirurgie vasculaire et cardiaque pour l'apprentissage de la suture vasculaire, pour la chirurgie viscérale et urologique notamment pour la réussite des sutures vasculaires des greffes de foie et de rein, etc.... Cet apprentissage doit se faire idéalement

pendant l'internat de chirurgie ou au maximum en début de prise de fonction comme chirurgien (pendant le clinicat ou l'assistantat).

Ce projet est une formation aux sutures vasculaires chez le rat. Après quatre cours magistraux et une séance sur des tubes silicones ou compresses, les étudiants participeront à 13 Travaux Pratiques (TP) sur le rat afin de réaliser des vaisseaux de taille décroissante, l'entraînement débutera par l'aorte abdominale, puis l'artère carotide et la veine jugulaire, puis l'artère rénale pour terminer par l'artère fémorale et l'artère caudale. Le recours à l'animal vivant est indispensable pour se familiariser avec la manipulation des tissus et apprécier la qualité des sutures (perméabilité, étanchéité).

Un examen et une séance de rattrapage sera organisée pour les étudiants qui n'auront pas validé leur épreuve la première fois. En cas d'échec, le candidat devra se réinscrire l'année suivante s'il le souhaite, et refaire de nouveau le DU en entier. Le nombre de rats pour la durée totale du projet sera de (15 rats par séances X 13 séances) sur 5 ans, soit 975 rats.

Dans le respect de 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.

Remplacement : En effet avant, de réaliser les sutures sur des animaux anesthésiés nous proposons une séance d'entraînement sur des tubes silicones et compresses afin de limiter le recours aux animaux en début d'apprentissage.

Réduire : Le nombre de rats inclus dans ce projet sera réduit au minimum grâce à l'utilisation des compresses et des tubes silicones mais aussi grâce à l'achat d'un seul rat supplémentaire par séance soit 15 rats par séance pour 14 étudiants.

Raffinement : Toutes les procédures seront supervisées par du personnel formé et compétent aux techniques expérimentales. En raison des interventions chirurgicales, l'évaluation et la prise en charge de la douleur seront particulièrement surveillées.

**20229** L'autophagie est un mécanisme d'autodigestion cellulaire qui consiste à enfermer dans des vésicules spécialisées, des éléments intracellulaires devenus inutiles. Il s'agit d'un processus fondamental, retrouvé à un niveau basal, dans toutes les cellules de l'organisme. En situations de stress comme lors de cancers ou maladies neurodégénératives, l'autophagie est rapidement induite pour tenter d'assurer la survie cellulaire. En situations non pathologiques, la privation de nutriments ou jeûne calorique induit fortement l'autophagie. Dans ce contexte de perturbation métabolique, la dégradation des composants cellulaires médiée par l'autophagie fournit aux cellules, des substrats énergétiques nécessaires au maintien des fonctions cellulaires.

Nous avons récemment identifié un nouveau facteur impliqué dans le processus autophagique. Après avoir analysé son impact sur des cellules en culture, nous avons besoin, à ce stade, de connaître son rôle *in vivo*, au niveau des différents tissus de l'organisme. Pour cela, nous souhaitons soumettre des souris transgéniques dénuées ou non du facteur d'intérêt, à un jeûne calorique de 24 heures, et analyser immédiatement l'implication moléculaire de notre facteur d'intérêt dans les mécanismes d'autodigestion cellulaire enclenchés dans les différents tissus de l'organisme. Les souris seront ainsi mises à mort à la fin du jeûne, pour assurer le prélèvement de sang et tissus nécessaires pour l'étude.

Nous appliquerons la règle des 3R :

Remplacer : En préambule à nos expérimentations animales, nous avons réalisé des expériences en cellules et réussi à valider l'impact de notre protéine d'intérêt *in vitro*. A ce stade, l'utilisation d'animaux vivants nous permettra de conforter nos résultats dans un système intégré. Ces expérimentations nous permettront de mieux comprendre la régulation fine utilisée lors des processus d'induction d'autophagie au niveau des différents organes et mieux appréhender les perturbations lors des cancers ou maladies neurodégénératives.

Raffiner : Nous avons choisi de limiter la restriction calorique à une durée courte de 24 heures. Durant cette période de carence nutritionnelle, les souris auront accès à l'eau à volonté afin d'éviter leur déshydratation. Aucun dommage n'est attendu pour l'ensemble des souris. Un suivi au cours des 24 heures de jeûne calorique permettra grâce à l'utilisation d'une grille d'observation clinique, de détecter précocement des signes potentiels de souffrance des souris (notamment de comportement, aspect ou mobilité) et décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, par la mise en œuvre d'une grille de score et de points limites adaptés.

Réduire : Nous limiterons la taille des échantillons à ce qui est strictement nécessaire pour garantir une puissance statistique acceptable. Le nombre total de souris prévu pour ce projet est : 72.

**20230** Le stress oxydant correspond à un déséquilibre entre le statut antioxydant et le statut pro-oxydant, en faveur d'une production massive des espèces réactives de l'oxygène. Le stress oxydant est associé à plus de 100 pathologies humaines dont l'hypertension et certains cancers. Ce stress cellulaire de l'oxydation est le facteur étiologique (le facteur causal) pour certaines maladies comme il peut se présenter aussi comme un facteur aggravant (un facteur secondaire) pour d'autres. Malgré cet état de fait, de nos jours peu de connaissances sur le lien entre le stress oxydant et le stress psychologique induit par l'anxiété sont disponibles. L'anxiété est un état émotionnel aversif qui correspond à un ensemble de composantes interagissant entre elles de façon complexe, parmi lesquelles on peut caractériser une réponse physiologique (exemple, l'accélération du rythme cardiaque et l'augmentation de la tension artérielle) et une réaction comportementale (par exemple, la fuite). Dans le passé, nous avons démontré qu'il y a un lien entre le statut oxydant et le niveau de l'anxiété chez la souris. Récemment, nous avons montré que le stress oxydant peut engendrer de l'anxiété chez l'animal. Dans cette présente étude, nous voudrions vérifier si le stress oxydant peut également se présenter comme une conséquence d'une expérience anxieuse.

Ainsi, l'objectif de ce projet est d'évaluer le statut oxydant des souris après avoir généré l'anxiété par la simple exploration d'un des 3 tests de l'anxiété : le test de la chambre claire/obscur (procédure 1), le test du labyrinthe en croix surélevé (procédure 2) et le test de l'open field (procédure 3). Les trois dites procédures sont largement utilisées par les chercheurs en neurosciences. Ainsi, ce projet s'articule autour de 3 procédures et nécessitera 40 animaux mâles adultes au total (n=10 / groupe), acclimatés en cycle inversé. Il s'agit d'une étude intégrée qui repose sur une démarche comportementale suivie d'une évaluation de leurs paramètres de stress oxydant (le taux du glutathion réduit qui est un antioxydant endogène, le taux des enzymes antioxydantes...) dans le sang et le cerveau, et qui ne peut en aucun cas être remplacée par d'autres approches telles que les études *in vitro* (Remplacement). Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux et suffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Ainsi, en mutualisant les groupes témoins, le nombre total des souris sera donc réduit à 40 au lieu de 60 (Réduction). Les animaux seront placés à 5 par cage pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé. Après deux semaines d'acclimatation aux conditions de l'animalerie, les tests seront réalisés pendant leur phase active et ainsi respectés leur horloge biologique interne (le cycle circadien). Des cocoon (fibres cylindriques de 100% coton) seront placés dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement). Nos résultats seront pertinents pour comprendre le lien entre le stress oxydant et l'anxiété, en évaluant les paramètres physiologiques de stress inhérents à la réponse émotionnelle de l'anxiété éprouvée durant chaque test éthologique.

**20231** La polyarthrite rhumatoïde (PR) est une maladie qui touche 0,5-1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme. La PR se caractérise par une inflammation des articulations avec une prolifération non-contrôlée des cellules synoviales. Malgré les progrès thérapeutiques, cette inflammation des articulations persiste chez certains patients et détruit les articulations. L'activité physique est connue pour être bénéfique sur le développement osseux, alors que l'absence d'activité semble être délétère sur l'os. L'utilisation de thérapies par l'augmentation de

l'activité physique a déjà montré des effets bénéfiques dans certaines pathologies ostéoarticulaires telle que l'arthrose. Cependant, peu d'études ont été réalisées sur l'effet de contraintes mécaniques sur l'évolution de la PR. L'activité physique est recommandée dans ce type de pathologie chronique. Cependant, des contraintes mécaniques trop importantes augmenteraient le risque de développer la PR par induction de signes inflammatoires. Notre équipe a récemment montré l'implication de YAP dans les pathologies inflammatoires telle que la PR. YAP est un facteur de transcription qui peut être activé en réponse à l'inflammation, mais aussi de façon mécanique par une rigidification de l'environnement cellulaire. L'utilisation de modèles *in vitro* a permis d'observer une influence positive du stress mécanique sur l'activité de YAP. Le but de ce projet est d'étudier le phénotype clinique d'arthrite ainsi que d'analyser la structure osseuse des articulations en réponse à différentes contraintes mécaniques chez le modèle rat AIA (Adjuvant-Induced Arthritis). Nous ne pouvons pas remplacer cette étape sur animaux. Le passage à l'animal constitue donc à ce niveau une étape essentielle pour déterminer l'effet de contraintes mécaniques sur l'évolution de la PR, ainsi que d'approfondir la compréhension de l'implication de YAP en réponse à ces contraintes mécaniques, avant d'envisager une approche chez l'humain. Le modèle choisi est l'AIA chez le rat du fait de sa grande similitude en termes de physiologie avec la PR développée chez l'Homme.

Le nombre d'animaux minimum pour réaliser cette étude est de 192. Le nombre d'animaux a été optimisé de façon à ce qu'un groupe serve de contrôle pour plusieurs procédures.

De plus, plusieurs étapes de l'expérimentation ont été raffinées afin de gérer au mieux la douleur des animaux. L'arthrite étant invalidante pour l'animal, les moyens d'accès à la nourriture et à l'eau ont été adaptés. La gestion de la douleur a récemment été améliorée chez ce modèle, par l'utilisation de nefopam qui est un anti-douleur n'impactant pas le développement de l'arthrite. L'injection d'adjuvant sera réalisée sous anesthésie gazeuse. Le suivi clinique de chaque animal sera réalisé grâce à des indicateurs systémiques et locaux reconnus dans l'arthrite. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé, avec des points limites mis en place qui permettront d'exclure l'animal de l'étude s'il présente des signes manifestes de souffrance ou une perte de poids excessive ( $\geq 20\%$  du poids initial). Chaque animal bénéficiera 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. Par ailleurs, les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi si l'expérience le permet (copeaux, tunnel transparent rouge, bâtonnets à ronger). L'eau et la nourriture seront mises à disposition ad libitum et de la musique sera diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

**20232** L'objectif de ce projet est de valider l'utilisation de la technique de tomographie de cohérence optique (OCT) chez le macaque cynomolgus pour l'examen des structures de l'œil et d'établir des valeurs et des images de référence pour la rétine, le nerf optique, la cornée, la chambre antérieure et l'angle irido-cornéen. Le développement de cette technique non invasive permettrait à l'avenir d'avoir une alternative à l'examen histopathologique de l'œil et permettrait de d'optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études précliniques lors du développement de médicament pour le traitement de maladies oculaires ou de traitement pouvant avoir une toxicité oculaire.

Le projet comprend une seule procédure de réalisation d'images par tomographie de cohérence optique sur les deux yeux de 12 primates non humains issus de projets antérieurs. La réalisation des images se fera sous anesthésie générale avec une surveillance et un suivi approprié réalisé par un vétérinaire.

L'obtention de valeurs de références en OCT pour les structures internes de l'oeil ne peut être réalisé ni *ex vivo* ni *in vitro*. Le primate non-humain a été choisi car aucune autre espèce ne présente une proximité anatomique suffisante avec l'homme sur les structures oculaires étudiées. Cette technique ayant vocation à être ensuite utilisée chez le primate non-humain, il est nécessaire que la validation des mesures se déroule sur cette espèce.

Le nombre d'animaux pour ce projet (12) est le nombre minimum possible permettant d'obtenir des données robustes malgré les variations inter-individus pour établir des valeurs de référence.

Les primates non humains sont hébergés en groupes sociaux stables dans des volières conformes aux normes européennes. Ils disposent d'un programme d'enrichissement avec un aménagement de leur environnement (litière, balcons, perchoirs, boîtes à fourrager, etc...) ainsi que des récompenses. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. Un vétérinaire sera présent pendant toute la durée du projet et aura toute autorité pour prendre les mesures adaptées afin de limiter tout inconfort éventuel.

Une fois le projet terminé, les animaux retournent dans la colonie.

**20233** Dans le système nerveux central (SNC) et périphérique (SNP), la conduction rapide et saltatoire du potentiel d'action est permise grâce à la gaine de myéline qui entoure les axones. Le processus de formation de cette gaine, appelé myélinisation est hautement régulé. L'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) est une protéine impliquée dans la myélinisation réalisée par les oligodendrocytes au sein du SNC. Il est notamment impliqué dans la migration des oligodendrocytes. Le tPA pourrait également avoir un rôle majeur lors de la formation de la gaine de myéline réalisée par les oligodendrocytes puisqu'il est exprimé de manière transitoire lors du processus de myélinisation (élongation, enroulement et/ou constitution d'une gaine de myéline compacte). Afin de comprendre le(s) rôle(s) du tPA lors de la myélinisation centrale voire périphérique, il est important de déterminer si cette expression transitoire est un processus spécifiquement associé à la myélinisation oligodendrocytaire ou s'il est commun aux deux types de cellules myélinisantes (cellules de Schwann et oligodendrocytes). La réponse à cette question permettra de mieux comprendre et d'orienter les recherches concernant le(s) rôle(s) du tPA dans le cadre de la myélinisation centrale et/ou périphérique.

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 du développement. La communauté scientifique dispose pour ces études d'un modèle animal permettant de suivre les processus de myélinisation. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire et dans la littérature grâce à ce modèle rend la souris particulièrement intéressante pour notre étude. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que l'expérimentation animale. Avant de procéder à une telle étude, nous nous assurons d'utiliser le nombre minimal d'animaux adéquat pour atteindre le résultat souhaité. Ainsi, les procédures expérimentales décrites dans ce projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information.

Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés pendant tout le projet. 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'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons au laboratoire montre que les animaux se déplacent et s'alimentent normalement, prennent bien soin de leur pelage, n'émettent aucun son et ne présentent aucun « sickness behavior syndrom ».

En prenant en compte ces recommandations, un total de 470 animaux sera utilisé lors de ce projet : 376 souris et 94 rats.

Mots clefs : développement ; myélinisation ; activateur tissulaire du plasminogène, cellules de Schwann ; oligodendrocytes.

**20234** Le cerveau est l'un des organes les plus complexes du corps de l'animal. Il est constitué de milliards de cellules qui sont classées en deux groupes principaux : les neurones et les cellules gliales. Les neurones sont considérés comme les cellules qui transfèrent, conservent ou analysent les



messages neuronaux, tandis que les cellules gliales sont considérées comme les cellules de soutien des neurones. Pour avoir un cerveau qui fonctionne correctement, les neurones et les cellules gliales doivent proliférer, migrer et entrer en contact les uns avec les autres de manière contrôlée. Le contact entre un neurone et une ou plusieurs autres cellules, principalement des neurones, est appelé synapse. Dans la synapse, les messages neuronaux peuvent être transférés à la cellule cible et moduler son activité. Récemment, il a été découvert que les cellules cancéreuses, en particulier les tumeurs cérébrales, sont l'une des cibles des neurones. Les tumeurs cérébrales reçoivent des messages neuronaux, en particulier des neurones excitateurs, qui les poussent à survivre, à croître ou à attaquer d'autres régions. Au cours du développement du cerveau, de nombreux gènes sont exprimés par les neurones et contrôlent la formation de contacts et de synapses adéquates. Certains de ces gènes ont également été trouvés dans les cellules cancéreuses. Dans ces cellules, la fonction de ces gènes n'est pas bien connue, mais d'après certaines preuves très récentes, ils peuvent avoir un effet stimulant sur la croissance du cancer. Un nouveau domaine interdisciplinaire est donc en train d'émerger : la neurobiologie du cancer. L'hypothèse qui sous-tend ce domaine est que le développement du cancer peut être régulé par le système nerveux.

Dans notre laboratoire, nous travaillons sur les gènes qui sont impliqués dans la formation des synapses entre deux populations de neurones. Parmi ceux que nous étudions, la voie de signalisation synaptique C1QL1/BAI3 est particulièrement pertinente pour l'étude du cancer. De manière surprenante, nous avons découvert que la molécule C1QL1 est aussi exprimée dans une sous-population de cellules gliales qui peuvent être à l'origine des tumeurs cérébrales. D'autres études ont montré que C1QL1 et BAI3 sont présentes en abondance dans certains gliomes. Nous voudrions donc déterminer le rôle de cette voie dans la prolifération de la sous-population gliale et sa contribution au développement des tumeurs cérébrales. Pour cela, nous allons réaliser chez la souris des greffes intracrâniennes de différentes lignées cellulaires tumorales murines et étudier la taille des tumeurs résultantes par mesure de la bioluminescence produite par ces cellules au niveau sanguin, ou par histologie, dans un environnement cérébral contenant ou non C1QL1. Une analyse au niveau moléculaire sera également réalisée après prélèvements des tissus cérébraux de souris des différents groupes.

Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 240 souris jeunes adultes à adultes sur 5 ans. La règle des trois R [1) Réduction, 2) Raffinement, 3) Remplacement] est appliquée dans la mesure où 1) le projet est conçu pour limiter le nombre de souris au minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides (détermination du nombre d'animaux grâce à l'évaluation rétrospective qui est en cours pour un autre projet appliqué dans un autre institut). Différentes analyses pourront être réalisées sur le cerveau de chaque animal : par exemple, la détermination du site d'injection des cellules cancéreuses, de son efficacité et l'analyse morphologique des greffes. 2) Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durable que pourraient ressentir les animaux. Ainsi, les techniques douloureuses et stressantes seront minimisées grâce à l'utilisation d'analgésiques et de techniques d'anesthésies lors des procédures invasives. Les souris manipulées seront observées chaque jour jusqu'à la fin des expériences. Tout signe de stress ou de douleur lors du suivi des animaux (perte de poids, pelage mal entretenu, nervosité à la manipulation, problème de locomotion) impliquera une application des soins nécessaires et si besoin une élimination de la procédure expérimentale. 3) Seule une publication scientifique existe à propos de l'effet de C1QL1 sur les caractéristiques des glioblastomes dans des systèmes cellulaires. Le rôle de la voie C1QL1/BAI3 dans les glioblastomes n'a jamais été étudié dans des modèles animaux, alors que la prolifération et l'invasion des tumeurs font intervenir des mécanismes complexes liés à l'environnement dans lequel la tumeur croît. L'utilisation d'animaux vivants est donc nécessaire pour notre projet. Une analyse préliminaire de la quantité de C1QL1 présente dans les nombreuses lignées cellulaires tumorales disponibles, nous a permis de sélectionner *in vitro* les quelques lignées intéressantes pour notre étude.

**20235** Les cancers de la peau sont parmi les plus fréquents des cancers avec près de 60 000 nouveaux cas par an en France. Les carcinomes squameux représentent 90% de ces cancers. Alors que des facteurs intrinsèques à la cellule tumorale, comme ses caractéristiques génétiques, peuvent être responsables du développement et de l'agressivité de ces cancers, il est maintenant reconnu que le microenvironnement tumoral joue un rôle majeur. Le but du projet est d'étudier comment ce microenvironnement favorise la progression des carcinomes squameux. Dans ce contexte, nous étudions le rôle des neutrophiles, cellules du système immunitaire, notamment des « Neutrophil Extracellular Traps » (NETs) dans le développement tumoral. Les NETs sont des filaments d'ADN recouverts de protéines qui sont relargués par les neutrophiles et visant à piéger et tuer de nombreux micro-organismes. Alors que plusieurs études, dont les nôtres, ont montré que les NETs participent à la progression tumorale, leur rôle dans la progression des carcinomes squameux n'est pas connu. Au laboratoire, il nous est possible d'étudier les carcinomes squameux *in vivo* grâce à un modèle de carcinome cutané induit chimiquement chez la souris FVB/N âgée de 7 à 9 semaines. Dans ce modèle, les souris sont traitées avec du DMBA (7,12-diméthylbenz[a]-anthracène) à la semaine 0 (S0) et S8 sur la peau du dos, avec une application bihebdomadaire de TPA (12-O-tétradécanoyl phorbol-13-acétate) de S1 à S7 et ensuite de S9 à S30 (qui marque la fin de l'expérience). On parle plus communément du modèle DMBA/TPA de carcinomes squameux. Les dommages causés aux animaux sont donc la formation de cancer de la peau sur le dos des souris (le DMBA/TPA étant appliqué sur le dos des souris). Nos résultats préliminaires générés sous un précédent CIEPAL, montrent que les carcinomes squameux issus du modèle DMBA/TPA sont riches en neutrophiles et NETs.

De manière intéressante, nos résultats *in vitro* montrent que les NETs favorisent les capacités tumorales des carcinomes squameux via i) l'activation des fibroblastes, qui remodelent ainsi la matrice extracellulaire et favorisent la progression tumorale ; ii) l'inhibition des lymphocytes cytotoxiques, cellules du système immunitaire qui normalement tuent les cellules tumorales.

Nous proposons maintenant d'étudier la pertinence de nos résultats *in vivo*. Pour cela, nous souhaitons étudier les effets de l'inhibition pharmacologique des NETs, des fibroblastes et des lymphocytes dans le modèle DMBA/TPA décrit ci-dessus. Des inhibiteurs pharmacologiques et des anticorps seront utilisés pour contrecarrer les effets des neutrophiles et NETs sur la progression des carcinomes squameux (injection quotidienne pour les inhibiteurs et tous les 3 jours pour les anticorps). Les souris seront traitées par les inhibiteurs/anticorps à partir de i) le début du traitement DMBA/TPA (procédure 1) ; ii) la semaine 7, soit juste avant l'apparition des premiers papillomes (précurseurs des carcinomes, procédure 2) ; iii) la semaine 15, soit juste avant l'apparition des premiers carcinomes squameux (procédure 3).

La croissance et la mort des cellules tumorales seront contrôlées par mesure des tumeurs primaires avec un pied à coulisse, et marquage hématoxyline éosine en fin d'expérience. Un nombre total de 6192 animaux sera utilisé pour répondre à nos questions scientifiques.

Ce projet est en accord avec la règle des 3R, comme définit ci-dessous.

**Réduction** : Le nombre d'animaux a été choisi pour détecter toute différence significative entre les groupes avec un nombre de souris minimum. Nos résultats générés *in vitro* et *in vivo* sous un précédent CIEPAL nous ont permis de générer une analyse statistique prévisionnelle permettant de réduire le nombre d'animaux utilisés dans toutes les procédures proposées.

**Remplacement** : L'utilisation de co-cultures de cellules tumorales/neutrophiles/fibroblastes/lymphocytes *in vitro*, utilisées en routine au laboratoire, et envisagées aussi souvent que possible, nous permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux, dans le respect de la règle des 3R.

**Raffinement** : Le bien-être animal sera évalué de manière objective grâce à des fiches d'évaluation adaptées à cette procédure. Ces fiches contiennent des points limites qui correspondent à un score maximum qui prend en compte plusieurs paramètres. Ces fiches nous permettront d'évaluer le statut des animaux et ainsi de décider de la poursuite de la procédure. De plus, le modèle DMBA/TPA est largement utilisé par la communauté scientifique, ce qui nous permet de connaître la cinétique de développement de la maladie et justifient les procédures proposées. Le suivi des

animaux utilisés sera réalisé 3 fois par semaine avec palpation et mesure de la taille des tumeurs et sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller l'état des animaux avec une évaluation objective des points limites. Les souris seront mise à mort 30 semaines après l'initiation de la carcinogénèse par le DMBA (S0) ou lorsqu'un point limite sera atteint, notamment par une taille de tumeur de 1,5 cm<sup>3</sup> atteint ou une ulcération de la tumeur.

**20236** La leucémie est un cancer caractérisé par la prolifération excessive et le blocage de la différenciation des cellules immatures du sang, localisées dans la moelle osseuse. Selon la cellule d'origine à partir de laquelle la maladie se développe et selon la vitesse de ce processus, on peut distinguer les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) et myéloblastiques (LAM) et les leucémies chroniques lymphoïdes (LLC) et myéloïdes (LMC). Parmi les LAL, on distingue les LAL-B (qui touchent les progéniteurs des cellules qui produisent normalement les anticorps) des LAL-T (qui touchent les progéniteurs des cellules impliquées dans l'immunité cellulaire). Au niveau moléculaire, cette maladie résulte de mutations qui activent des oncogènes (gènes promoteurs de cancers) ou inactivent des gènes suppresseurs de tumeur, à travers des mécanismes qui, aujourd'hui, ne sont pas encore complètement compris.

Les leucémies affectent enfants et adultes, et malgré le fait que dans les dernières années beaucoup de progrès ont été fait du point de vue thérapeutique, des rechutes fatales sont observées dans 20 % des cas pédiatriques et 50% des LAL-T de l'adulte. Il est donc essentiel de poursuivre la dissection des mécanismes moléculaires conduisant à ces pathologies pour concevoir des thérapies ciblées pouvant améliorer la survie des patients leucémiques.

Résumé de la recherche :

Remplacement : Des données préliminaires, obtenues notamment *in vitro* montrent que plusieurs récepteurs/ligands et protéines de signalisation sont impliqués dans les propriétés pro-apoptotiques (mécanismes de mort, ici de cellules leucémiques) des anticorps thérapeutiques étudiés au laboratoire. Cependant, les expériences *in vitro* utilisées dans le cadre du « Remplacement » ne sont qu'une vue simplifiée de la « vie » d'une cellule leucémique et ne tiennent pas compte de l'interaction d'une cellule cancéreuse avec son environnement qui lui apporte des éléments de survie grâce à la production de facteurs de croissance etc...L'utilisation de modèle *in vivo* est donc nécessaire afin de vérifier si l'inhibition/activation de ces voies de signalisation peut augmenter la vulnérabilité des cellules leucémiques au traitement par les anticorps. L'objectif est de tester ces molécules sur les modèles les plus pertinents à savoir des cellules provenant directement de patients (biopsies) et inoculées à des souris permettant leur greffe.

Réduction : Ces LAL-T étant génétiquement hétérogènes il est nécessaire de tester au moins 6 types différents de leucémies T afin d'analyser si ces inhibiteurs ont un spectre large ou spécifique. Le nombre de souris par groupe (5) permet une analyse statistiquement pertinente (Anova/Test Tukey) et prévient la répétition des expériences. Dans le cadre de la règle de « Réduction » et afin de valider la spécificité d'action de ces inhibiteurs, seule une tumeur génétiquement modifiée pour éteindre l'expression de la protéine cible de cet inhibiteur, sera analysée en réponse à cet inhibiteur. Un maximum de 2286 souris seront donc concernées par ce projet.

Raffinement : Tous les animaux seront quotidiennement examinés en accord avec une grille de score pré-établie, dans le cadre de la prise en charge de la douleur afin de détecter une potentielle souffrance.

**20237** 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 compagnies 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 enfant 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 une seule fois sur 8 chiens mâles adultes (volume appliqué: 2.5 mL). Chaque chien sera ensuite caressé à différents intervalles de temps et jusqu'à 28 jours après l'application par un opérateur équipé de gants selon une procédure bien définie. La quantité de produit présent sur les gants sera ensuite déterminer 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 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.

**20238** Le tissu osseux est en remaniement constant pour une adaptation optimale aux contraintes mécaniques grâce au processus de remodelage. Tout au cours de la vie, la masse osseuse est sous l'influence de plusieurs catégories de facteurs dont les facteurs mécaniques impliquant la gravité et l'activité physique.

Une diminution ou une absence de contrainte mécanique s'exerçant sur le squelette entraîne des modifications du tissu osseux avec pour conséquence une perte osseuse plus ou moins importante et un risque accru de fractures : on parle alors d'ostéoporose d'immobilisation.

Dans l'ostéoporose d'immobilisation, cette perte osseuse est associée à une fonte musculaire qui s'explique par la relation étroite entre le muscle squelettique et l'os : ces deux entités anatomiques synchronisent, de manière mécanique et biochimique, leurs réponses à un stimulus. Certaines molécules issues de l'os ou du muscle médient la communication entre ces entités anatomiques. Cette communication est également régulée par des facteurs externes, notamment issus du système nerveux. Cette régulation modifie aussi le métabolisme musculaire et/ou osseux.

Différentes situations cliniques conduisent à l'ostéoporose d'immobilisation : lésions médullaires consécutives à des accidents domestiques, sportifs ou de la circulation ; maladies nécessitant un alitement prolongé ; contention d'un membre ou bien encore mobilité réduite, fréquente chez le sujet âgé. Dans ces différentes situations, l'os et le muscle sont souvent traitées séparément parce que les mécanismes moléculaires de la communication os/muscle sont encore mal connus. La prise en compte de ces deux entités anatomiques est donc capitale pour mieux comprendre et traiter la fragilité osseuse associée à une atrophie musculaire.

Une dizaine de molécules produites par l'os ou le muscle et impliquées dans la communication entre ces tissus ont été identifiées (IL-6, RANKL, irisine, myostatine, IGF-1, Wnt3a ...). Certaines d'entre elles ont été évaluées dans la prévention de l'ostéoporose d'immobilisation et aucune ne s'est avérée totalement efficace.

D'autre part, des données récentes soulignent le rôle du système nerveux autonome sympathique. Dans ce système, la voie bêta2-adrénergique est tout particulièrement intéressante car elle a une action à la fois sur le tissu osseux et le tissu musculaire.

De nombreux modèles animaux chirurgicaux ou non chirurgicaux ont été développés pour étudier la perte osseuse liée à l'immobilisation et tester des traitements ciblant l'os pour réduire la perte osseuse. Un des modèles non chirurgicaux décrit il y a 20 ans consiste en une immobilisation localisée par injection intramusculaire de toxine botulique. Celle-ci provoque une paralysie temporaire qui induit une fonte musculaire et une perte osseuse rapide. Ce modèle développé chez le rat et la souris a été utilisé à maintes reprises pour caractériser les mécanismes tissulaires, cellulaires et moléculaires de la perte osseuse liée à l'immobilisation. Les médiateurs de la communication os-muscle et les mécanismes de sa régulation n'ont été que très peu explorés.

En conséquence, en utilisant le modèle d'immobilisation par la toxine botulique, notre projet vise à étudier :

1/ l'expression au cours du temps de gènes codant des molécules clés de la communication os/muscle et de sa régulation par le système nerveux ;

2/ l'influence du système nerveux autonome sympathique en testant les effets d'agoniste et d'antagoniste de cette voie sur la qualité osseuse et la masse musculaire.

Notre projet nécessite l'utilisation de 312 souris réparties en 26 lots. L'effectif de chaque lot est celui minimal pour obtenir des informations valides et des tests statistiques performants.

Mesures prises pour l'application de la règle des 3 R :

- Le remplacement : les études des interactions os-muscle ne peuvent être réalisées que chez l'animal car elles nécessitent d'isoler des pièces entières du squelette et les muscles qui leur sont rattachés. Le choix de la souris est conforme à un grand nombre d'études sur l'ostéoporose de l'immobilisation. De plus, c'est l'espèce la plus adaptée à l'étude de l'expression des gènes à partir d'échantillons d'os.

- La réduction : l'effectif de chaque lot est celui minimal pour obtenir des informations valides et des tests statistiques performants. D'autre part, le modèle de paralysie sur un seul membre, outre le fait de s'affranchir d'une technique chirurgicale, permet qu'un même animal soit son propre témoin (côté paralysé versus côté non paralysé) et ainsi d'éviter des lots supplémentaires témoins.

- Le raffinement : il sera appliqué en effectuant l'administration intramusculaire de toxine botulique sous anesthésie générale. Cette procédure n'étant pas douloureuse, une analgésie légère sera appliquée si nécessaire.

La gestion du bien-être animal sera assurée par un hébergement des animaux selon les standards prévus par la réglementation, en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi.

Les animaux seront surveillés tous les jours et seront pesés une fois par semaine. Une liste de points limites et une grille d'évaluation de la sévérité des réactions non-désirées préalablement établies permettra de s'assurer du bien-être des animaux.

**20239** Objectif : Ce projet a pour objectif de permettre à nos clients d'étudier chez le chien l'innocuité et/ou la tolérance de produits pharmaceutiques vétérinaires (vaccins, anti-inflammatoire...)

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation/dose, au moins 2 chiens seront traités avec la voie d'administration et la posologie recommandée par le fabricant ou jusqu'à 10 fois la dose. Un groupe d'animaux non traités ou traités avec un placebo ou un produit de référence pourra être inclus pour servir de témoin.

Pour le développement d'un produit pharmaceutique, les différentes formulations/doses candidates doivent être comparées entre elles afin de déterminer celle qui sera la mieux tolérée par l'animal. L'innocuité au point d'administration doit également être vérifiée.

Bénéfice attendu : développement et mise sur le marché des médicaments avec la formulation/posologie optimale et la mieux tolérée.

Domages attendus : Il n'est pas attendu de dommage durable ou d'effet secondaire grave suite à l'administration du traitement car l'absence de toxicité des produits testés aura préalablement été vérifiée par le Donneur d'Ordre.

Mise en pratique des 3R :

- Remplacer : L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée car ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode alternative pour ce type de test.

- Raffiner : Les volumes administrés respecteront les recommandations du Gircor en fonction de la voie d'administration. L'innocuité et la tolérance du traitement seront évaluées grâce à des examens cliniques généraux incluant une prise de température et des examens locaux au site d'administration ou tout autre mesure peu ou non invasive. Eventuellement quelques prélèvements sanguins pourront être réalisés afin de s'assurer que le traitement est administré dans de bonnes conditions. La fréquence et le volume des prélèvements seront déterminés dans le respect du bien-être et de la santé des animaux et respecteront les recommandations du Gircor. Les interventions effectuées dans ce projet seront réalisées par des personnes compétentes et les techniques utilisées viseront à limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux.

Un suivi attentif des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe de douleur ou d'inconfort au cours des tests. Des mesures adaptées de gestion de la douleur et de l'inconfort seront prises le cas échéant, et, en fonction de la gravité, la nécessité d'arrêt du test sera évaluée pour les animaux concernés.

- Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour ce projet correspond au minimum requis pour répondre à l'objectif. L'estimation du nombre maximum d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 300 chiens. Lorsque cela sera possible (sans impact sur les objectifs de l'étude), le nombre d'animaux utilisé sera diminué par la réutilisation éventuelle de certains animaux et/ou la mise en place d'une procédure en cross-over après une période de repos permettant que l'animal ait pleinement recouvré son état de santé et de bien-être général.

**20240** Ce projet s'inscrit dans une démarche d'amélioration de notre banc d'exposition des animaux à des solvants industriels. Actuellement, les animaux sont exposés à des solvants industriels dans des chambres à inhalation à hygrométrie et température variable de façon statique pendant 6 heures. Afin de mieux représenter l'activité au travail des salariés de l'industrie, ce banc doit être amélioré en mettant en mouvement les rats. Dans cet objectif, un nouveau dispositif sous forme d'une roue d'activité forcée a été élaboré au laboratoire. Ce dispositif est encore sous la forme d'un prototype à tester avant de rendre son utilisation plus systématique. Les tests permettront d'étudier plusieurs paramètres tels que le comportement de l'animal dans la roue jusqu'à 6h, la vitesse de rotation et le temps de rotation de la roue pour déterminer des séquences d'activité alternant marche et repos. L'optimisation de la vitesse et du temps de rotation est primordiale pour établir des minima et maxima sans fatiguer l'animal, seule la marche sera proposée. De même, les tests seront réalisés en présence des opérateurs qui pourront attester que l'animal n'est pas en mal-être et un biberon d'eau équipe chaque roue pour que l'animal puisse s'abreuver ad libitum. Ce projet sera réalisé avec des femelles Long-Evans âgées de 3 mois minimum. Un lot de 8 rates sera nécessaire afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les tests de la roue d'activité forcée seront le sujet de la procédure n°1. La procédure n°2 sera consacrée au suivi des paramètres physiologiques de l'animal. En effet, les séquences d'activité mises en place dans la procédure n°1 devront être basées sur une augmentation de la fréquence cardiaque ou respiratoire et du volume pulmonaire du rat. Pour mesurer ces paramètres, un équipement sous la forme d'un gilet équipé de capteurs reliés à une batterie portée sur le dos du rat comme un sac à dos, a été retenu. Cet équipement a l'avantage d'être non invasif mais il est doté d'une technologie récente qu'il est nécessaire de tester dans nos conditions d'exposition. A savoir, les informations sont transmises par ondes Bluetooth depuis le boîtier porté par l'animal jusqu'au boîtier transmetteur. Lors d'une exposition, ils sont placés dans des chambres d'inhalation dont les portes vitrées ainsi que le maillage grillagé des cages (ou de la roue) peuvent diminuer le

signal. Nous intégrerons donc dans nos protocoles d'essais préliminaires de roues d'activité forcée cette méthode commerciale afin d'éprouver sa fiabilité et sa sensibilité.

Dans la suite de la procédure n°2, nous comparerons la méthode "gilet" avec une méthode de pléthysmographie qui est notre méthode de référence à ce jour pour mesurer les paramètres respiratoires chez le rat. Le protocole de mesure par pléthysmographie est décrit dans la procédure n°3. Les rats sont placés dans des tubes de contention équipés de capteurs de pression qui mesurent les variations de pression à l'intérieur de ces tubes. Quand l'animal inspire, la cage thoracique se gonfle ce qui augmente la pression dans le tube, et inversement à l'expiration. La succession des diminutions et augmentations de pression dans le tube donne la fréquence respiratoire de l'animal. Cette méthode demande aux rats de rester en contention pendant 2 heures, il est donc intéressant de comparer ces deux méthodes puisque les gilets présentent l'avantage de laisser les rats libres dans leurs mouvements. Après l'étude statistique des résultats obtenus, l'équipe de chercheurs prendra la décision ou non de s'équiper avec ce matériel pour les futures études du laboratoire.

Par ailleurs, ce projet n'est source d'aucune douleur pour l'animal, néanmoins, il tient compte de l'anxiété de l'animal et des actions seront menées afin de la réduire. En effet, chaque procédure est concernée par une période d'habituation aux équipements utilisés en plus d'une manipulation quotidienne par les zootechniciens ou les intervenants sur ce projet.

Enfin, les animaux seront mis à mort lorsque la procédure la plus longue sera terminée, à savoir la procédure n°1 qui peut s'étaler sur 2 ans. Dans un objectif de raffinement, leur mise à mort sera réalisée par une méthode adaptée au prélèvement de sang et d'organes (cerveau, poumons, ...).

Le remplacement de l'animal n'est malheureusement pas envisageable car il est indispensable d'observer le comportement des rats avec ces nouveaux équipements dans les conditions expérimentales de notre banc d'inhalation. De plus, nous mesurerons des paramètres cardio-respiratoires sur des animaux en mouvement dans des roues d'activité forcée placée dans des enceintes d'inhalation et cela n'est pas simulable *in silico* ou *in vitro*.

**20241** L'obésité est reconnue comme la cinquième cause de mortalité par l'OMS. Parmi les obèses, 80% développeront un diabète de type 2 ou une maladie cardiovasculaire. L'obésité est une pathologie complexe mettant en jeu des perturbations concomitantes dans différents tissus, qui ne peuvent être étudiées par l'utilisation exclusive d'expérimentations *in vitro* qui représentent mal les processus d'échanges d'informations entre organes impliqués dans la mise en place progressive de la pathologie. L'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter l'obésité et les pathologies associées, passe donc par l'utilisation de modèles animaux qui puissent reproduire les processus physiologiques et développementaux de la pathologie, observés chez l'homme. En particulier, le muscle squelettique responsable de la captation d'une grande partie du glucose sanguin sous l'influence de l'insuline, est affecté en premier en devenant insulino-résistant et il est donc important de développer de nouveaux traitements ciblant spécifiquement l'insulino-résistance musculaire afin de prévenir le développement du diabète. Actuellement les modèles rongeurs sont souvent utilisés alors qu'ils ont montré de nombreuses limites. Notamment, 1°) Peu de souches deviennent spontanément obèses; 2°) les rongeurs obèses ont souvent des atteintes cognitives graves qui affectent leur comportement alimentaire (surdité, cécité, fatigue, hyper toiletage...détectés très tard), 2°) le niveau élevé de consanguinité dans les élevages augmente la fréquence des anomalies génétiques et représente mal la diversité de l'étiologie observée chez l'homme. Dans ce contexte, le poisson zèbre *Danio rerio* s'avère être un bon modèle pour étudier les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement de l'insulino-résistance musculaire. Le poisson zèbre présente des similarités fonctionnelles/transcriptomiques avec l'homme pour le métabolisme des lipides et des glucides. Sa transparence dans les premiers jours de vie permet l'utilisation de techniques de microscopie de pointe pour suivre les altérations musculaires très tôt dans le développement de la pathologie et identifier les acteurs moléculaires précoces qui pourront être la cible de nouveaux traitements dans le diabète. Ainsi, il nous faut développer un modèle de poisson 'obèse' et bien le caractériser au niveau musculaire, ce qui n'a jamais été fait auparavant

sur des souches sauvages non génétiquement modifiées. Ce projet permettra pour la première fois, d'avoir un modèle d'insulino-résistance musculaire induite par une surnutrition chez le poisson zèbre.

Remplacement : L'obésité est une pathologie métabolique complexe qui ne peut être complètement comprise par des expérimentations purement *in vitro*, qui ne représentent pas les échanges d'informations entre organes impliqués dans la mise en place progressive de la pathologie. Le développement d'un modèle poisson zèbre doit permettre de s'affranchir de ces limites.

Réduction : Les souches sauvages deviennent spontanément obèses suite à une surnutrition sans avoir à induire des modifications génétiques, limitant le nombre d'animaux pour obtenir le phénotype à observer. Le nombre d'animaux sera réduit en réalisant les explorations métaboliques et les analyses génomiques sur le même individu. Ceci permet aussi de diminuer la variabilité statistique. Le haut taux de reproduction des poissons permet aussi de suivre les altérations métaboliques au niveau de la descendance sans devoir maintenir les géniteurs obèses sur de longues périodes d'élevage.

Raffinement : Raffinement : Le développement rapide de l'obésité permet d'établir des points limites suffisamment prédictifs et précoces pour éviter toute souffrance inutile. Les animaux sont observés régulièrement 4 fois par semaine. Les poissons seront hébergés en groupe formé d'individus et seront nourris par un robot à heure fixe pour éviter tout stress. Afin d'éviter tout mal-être de l'animal des points limites adaptés à chaque procédure, suffisamment prédictifs et précoces, ont été établis. Ce projet prévoit l'utilisation de 288 poissons zèbres.

**20242** L'hypoparathyroïdie est une maladie rare caractérisée par une absence ou une diminution sévère de la sécrétion de PTH conduisant à une diminution de la concentration plasmatique en calcium. L'hypoparathyroïdie peut être congénital mais la cause la plus fréquente est représentée par une altération des glandes parathyroïdes lors d'une chirurgie du cou. L'hypoparathyroïdie est associée à des troubles physiologiques, tels que fatigue, crampes/douleurs musculaires, engourdissement, tétanie et douleur/fragilité osseuse et à un impact considérable sur la qualité de vie des patients.

La supplémentation en calcium et en vitamine D mais également l'administration de PTH recombinante sont utilisés pour la prise en charge de l'hypoparathyroïdie. Bien que ces molécules soulagent la majorité des troubles physiologiques, elles ne permettent pas de réduire la fragilité osseuse. Pire, les suppléments calciques sont même responsables de calcifications ectopiques des reins et des yeux. Ces observations mettent en lumière le besoin urgent de nouveaux traitements pour prévenir la fragilité osseuse chez les patients atteints d'hypoparathyroïdie.

Une régulation du métabolisme osseux par le système gastro-intestinal a été établie. Les récepteurs de certaines hormones intestinales sont exprimés par les cellules osseuses et les souris déficientes en ces récepteurs présentent une fragilité osseuse. Précédemment, des analogues stables des hormones intestinales ont pu être développés et leurs administrations dans des modèles murins de fragilité osseuse (ostéoporoses, diabète de type II) se sont montrées concluantes. Ces molécules pourraient représenter une alternative intéressante dans la prise en charge de l'hypoparathyroïdie.

Les buts de ce projet de recherche sont multiples :

(1) de développer un modèle reproductible d'hypoparathyroïdie chez le rat, présentant les altérations physiopathologiques observées chez l'homme

(2) de valider l'efficacité d'analogues stables des hormones intestinales sur la réduction de la fragilité osseuse induite par l'hypoparathyroïdie dans le modèle de rats. Les résultats escomptés sont de montrer la supériorité de tels traitements comparés aux thérapies actuelles.

Ce type de projet requiert une étape de développement et validation du modèle animal mis également de ces analogues *in vivo* avant une possible utilisation chez l'homme. Cette validation nécessite l'utilisation de modèles animaux et ne peut être remplacée par d'autres tests. Un total de 216 animaux, répartis en 18 lots, est requis pour conduire à bien ce projet. Ce nombre d'animaux a été déterminé après analyse statistique de l'échantillonnage à partir de données obtenues préalablement et constitue le plus petit nombre d'animaux permettant d'aboutir à des résultats



significativement exploitables scientifiquement. Une grille de point limite a été mise en place pour réduire les souffrances des animaux survenant pendant le déroulement du projet. Les animaux seront hébergés selon les standards prévus par la réglementation, en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi. Une surveillance quotidienne des animaux sera réalisée.

**20243** Le système immunitaire défend et protège notre corps contre les infections et les maladies. Il est formé d'organes, de cellules particulières et de substances qui agissent ensemble pour trouver et combattre les germes, comme les virus ou les bactéries ou encore les cellules anormales ou malsaines qui provoquent des maladies telles que le cancer. Cependant, notre système immunitaire peut aussi se déréguler et s'attaquer alors à des composants normaux de l'organisme (le « soi ») entraînant alors le développement de maladies auto immunes. Ces dernières sont devenues la 3<sup>e</sup> 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.

Malgré l'évolution des traitements, 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. Il semble donc urgent de mieux comprendre ces pathologies, les éventuels biomarqueurs ainsi que les cibles thérapeutiques associées à chaque sous-groupe permettant ainsi d'adapter les traitements.

La souris présente certains traits caractéristiques similaires à l'Homme dans la biologie des réactions immuno-inflammatoires rendant ainsi pertinente son utilisation.

Dans ce cadre, un modèle répandu dans le domaine des maladies auto immunes est d'administrer à des rongeurs une molécule non reconnue comme du soi par le système immunitaire provoquant artificiellement une réponse notamment l'activation de l'immunité dite adaptative (lymphocytes B et T) et l'augmentation de la production d'anticorps. (Caractéristiques des maladies autoimmunes.). L'évaluation du candidat médicament dans ce type de modèle sera basé sur sa capacité à diminuer l'activation du système immunitaire, et donc évaluer son potentiel en traitement des maladies auto immunes.

Dans le processus de développement d'un candidat médicament, ce type d'étude se situe en aval des études *in vitro* et *in silico* et en amont de toutes études d'efficacité sur un modèle pathologique. Il permet de sélectionner les candidats sur la base de leur capacité à diminuer l'activité du système immunitaire et également d'étudier la biodisponibilité de ces candidats (distribution de la molécule dans le corps durant les traitements).

Le but de ce projet est de :

1/ mettre au point les conditions expérimentales puis valider le modèle d'activation du système immunitaire en réaction à l'injection de la protéine KLH sur des souris non modifiées génétiquement. La protéine KLH est issue d'un mollusque marin, elle ne présente aucune homologie avec les protéines humaines et elle est inoffensive pour l'humain comme pour les rongeurs et est capable d'induire une réponse de l'immunité adaptative. Certaines études publiées utilisent un adjuvant lors de l'immunisation pour favoriser une réponse immunitaire et différentes voies d'administration sont rapportées. La nécessité ou pas d'adjuvant et la voie d'immunisation seront donc évaluées dans cette première partie. L'évaluation reposera essentiellement sur des dosages biologiques

2/ La deuxième étape consistera à valider les conditions déterminées en 1/ en utilisant un composé de référence connu pour diminuer l'engagement du système immunitaire

3/La troisième étape consistera à vérifier que la cible thérapeutique d'intérêt suspectée d'être impliquée dans les pathologies d'immuno inflammation étudiées est activée dans ce modèle en mesurant son expression à deux différents temps dans différents organes de la souris.

En fonction des cibles et de leur homologie entre la souris et l'homme il pourra être nécessaire de mettre en place ce modèle chez des souris génétiquement modifiées porteuses du gène humain.

4/ Des études avec les candidats médicaments seront effectuées pour sélectionner ceux ayant une biodisponibilité adéquate et une incidence sur la diminution de l'activation du système immunitaire

Les études incluses dans ce projet prévoient des évaluations cliniques et biologiques (prélèvements sanguins pour notamment doser la présence des anticorps en cours d'étude et prélèvements d'organes et de tissus à leur issue après euthanasie des souris, pour valider l'expression des différentes cibles thérapeutiques).

Les objectifs de ce projet sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire et raffiner) :

**Remplacement** –L'efficacité thérapeutique d'un candidat médicament ne peut être démontrée qu'après administration chez l'animal, dans le contexte d'un organisme complet et complexe incluant l'ensemble des mécanismes physiopathologiques. Seules les molécules les plus pertinentes et les plus avancées dans leur développement seront administrées *in vivo*.

**Reduction** –Le nombre d'animaux utilisés sera adapté en fonction de l'étape de mise au point et un accompagnement par le service Biostatistique sera assuré afin d'affiner les designs expérimentaux, d'estimer la variabilité des paramètres et in fine le nombre d'animaux nécessaire par groupe.

**Raffinement** – L'administration de la protéine KLH en voie sous cutanée nécessite d'utiliser un adjuvant pour potentialiser la réaction du système immunitaire. Nous avons choisi d'utiliser un adjuvant connu pour minimiser voire éliminer les effets indésirables classiquement retrouvés avec les adjuvants historiquement plus

Des prélèvements de sang répétés en cinétique sont réalisés à différents temps afin de mesurer les paramètres biologiques d'intérêt et/ou le taux plasmatique du médicament. Les prélèvements de sang sont effectués selon la technique du « multisampling », méthode systématiquement privilégiée par rapport aux autres techniques usuelles car rapide, réalisable plusieurs fois sur un même individu, et respectant les volémies et les conditions physiologiques de la souris. Cette technique permet également de réduire considérablement le nombre d'animaux inclus par étude

Un suivi quotidien des animaux sera 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 souris en cas d'atteinte de points limites prédéfinis. Les souris seront hébergées en groupes sociaux et disposeront de matériel de nidification dans leur cage d'hébergement.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 1558 souris sur un maximum de 5 ans. Ce nombre est estimé en fonction des données disponibles (bibliographie, données externes) et de la variabilité des paramètres qui seront examinés.

**20244** Cette étude se place dans le cadre de recherches menées sur les cancers du rein et plus précisément sur les carcinomes rénaux à translocation (CRT) qui représentent 40% des cancers du rein chez l'enfant. Ce sous-type de cancer du rein n'a été décrit qu'en 2004, très peu de choses sont donc connues sur son développement, ses caractéristiques et ses traitements. Des études préliminaires sur des cellules tumorales ont été réalisées en laboratoire prouvant l'importance de protéines spécifiques. Ainsi, l'apparition des CRT est caractérisée par l'expression d'une protéine anormale mais fonctionnelle, obtenue par la fusion de portions de protéines normales. Différentes protéines de fusion peuvent être exprimées faisant des CRT un groupe hétérogène de sous-type de cancer. L'utilisation de modèles animaux est indispensable pour la compréhension globale du développement du cancer et l'identification de cibles thérapeutiques. En effet, bien que les modèles cellulaires utilisés en laboratoire soient utiles, ils restent limités puisqu'ils ne prennent pas en compte l'interaction des cellules tumorales avec leur environnement (système immunitaire, réseau sanguin, formation de métastases, ...). Or, il a été montré chez des patients présentant des CRT que l'expression d'une fusion donnée menait à un carcinome plus agressif bien que plus infiltré par le système immunitaire comparé à d'autres fusions. Les interactions entre tumeurs et microenvironnement jouent donc un rôle central dans le développement d'un cancer et la réponse à un traitement, d'où la nécessité d'utiliser des systèmes plus complexes tels qu'un modèle de souris.

Ce projet a donc pour but principal de développer des modèles souris surexprimant ces protéines identifiées et de comprendre le mécanisme général impliqué. Ces modèles animaux n'ayant encore jamais été décrits, l'objectif premier de cette étude pilote est d'évaluer la capacité des protéines identifiées à former des tumeurs à la fois dans le rein mais aussi dans le reste de l'organisme. Si des tumeurs se forment, les animaux seront mis à mort avant atteinte des points limites et le rein et autres organes d'intérêt seront prélevés pour analyser les caractéristiques moléculaires des tumeurs. Ces analyses post-mortem permettront de comprendre les mécanismes impliqués dans l'apparition et le développement des CRT mais mèneront également à l'identification de cibles thérapeutiques potentielles.

Dans un premier temps, 154 animaux seront utilisés pour vérifier l'expression correcte chez les animaux mâles et femelles de 4 protéines d'intérêt identifiées comme étant la cause de l'apparition de CRT. Ces protéines seront exprimées soit spécifiquement dans le rein soit dans tout l'organisme. Puis, l'étude du développement et des caractéristiques macroscopiques et moléculaires des tumeurs se fera sur 300 animaux (3 cohortes de 20 animaux contrôles (les mêmes animaux contrôles seront utilisés pour les différentes cohortes expérimentales dans un souci de réduction du nombre d'animaux); 4 cohortes de 40 animaux avec expression spécifique dans le rein de différentes protéines ; et 4 cohortes de 20 animaux avec expression dans tout l'organisme de ces mêmes protéines). L'expression de ces protéines d'intérêt sera provoquée par injection d'une substance. Cette expression sera d'abord vérifiée par biopsie afin d'éviter la mise à mort de ces animaux, soit de la peau, pour les modèles avec expression dans tout l'organisme, soit du rein sous condition d'anesthésie et analgésie au réveil puis ces mêmes animaux seront intégrés dans l'étude de survie globale.

Les animaux seront hébergés en cohortes dans un environnement enrichi afin de conserver les interactions sociales et seront tous suivis quotidiennement, avec limitation de la douleur grâce à des traitements antalgiques ou une mise à mort anticipée dès atteinte des points limites (perte de poids anormale, tumeur visible de plus de 1cm<sup>3</sup>, état général de l'animal dégradé).

## **20245 CONTEXTE**

L'adénocarcinome pancréatique fait partie des cancers les plus agressifs. Quel que soit le traitement, le taux de survie global à 5 ans est inférieur à 5%. Cette maladie est souvent diagnostiquée à un stade avancé et, par conséquent, seulement 15% à 20% des patients sont candidats à une résection chirurgicale. Environ 30% à 40% des patients ont une maladie métastatique au moment du diagnostic et dans ces cas, la survie est d'environ 9 mois. Les 30% à 40% restants des patients ont un cancer pancréatique localement avancé au moment du diagnostic, leur survie globale médiane est d'environ 1 an. Bien que de nouveaux protocoles de chimiothérapie entraînent une survie améliorée, le pronostic pour le cancer pancréatique localement avancé reste sombre et sans perspective de survie à long terme. Un traitement physique des tumeurs à l'aide d'ultrasons focalisés à haute intensité (HIFU) est à l'étude depuis de nombreuses années notamment sur le foie. Suite aux résultats prometteurs sur le foie, l'application au cancer du pancréas est apparue comme évidente et les résultats des travaux sur le foie servent également pour le pancréas. Les HIFU concentrent les ultrasons en un point et permettent la destruction du tissu visé. En effet, ils permettent d'élever localement la température à distance de la sonde qui les émet sans abîmer les tissus qu'ils traversent. Les cellules de la zone cible vont alors mourir. Cette zone de cellules mortes est donc appelée lésion.

Il a été démontré dans un premier temps qu'il était possible de détruire du tissu pancréatique sain par un traitement par HIFU. Selon la localisation possible de la tumeur dans le pancréas chez le patient et afin de fournir le plus d'outil au chirurgien, deux séquences de traitement par HIFU seront testées (une superficielle et une profonde).

### **OBJECTIF**

La procédure chirurgicale chez le porc sain est maîtrisée et la séquence de traitement des zones profondes du pancréas est fixée. Cependant, il est nécessaire de prouver que chaque lésion effectuée par un traitement sera sensiblement identique en vue du passage en clinique. Il est

important de déterminer la répétabilité de chaque traitement (zone profonde et zone superficielle du pancréas).

La forme sera également évaluée par IRM afin de visualiser la conformation spatiale des lésions créées.

#### TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche translationnelle d'une durée maximale de 1 an mettra en œuvre au maximum 16 porcs. Ce projet constitue une étape importante avant l'utilisation de la technique en clinique chez les patients. Des porcs sains sont utilisés car il n'existe pas de modèle de tumeur du pancréas chez le porc. Au cours d'une procédure jugée modérée, les animaux subiront une laparotomie (ouverture de l'abdomen) sous anesthésie générale au cours de laquelle le pancréas est exposé, le traitement HIFU d'environ 12 min sera effectué puis seront suturés avant d'être réveillés et maintenus sous observation pendant 2 jours, et seront ensuite mis à mort et autopsiés. Des contrôles échographiques seront effectués avant et après traitement. 1 à 2 animaux par groupes passeront à l'IRM pour l'évaluation de la forme de la lésion créée par le traitement HIFU.

#### CONFORMITE AVEC LES 3R :

##### Réduction

8 lésions par type de traitement seront effectuées. Une lésion sera effectuée par porc (une ronde plutôt superficielle ou une triangulaire plutôt profonde). Cependant, il sera évalué sur le premier porc s'il est possible d'effectuer les deux types de lésion sur un porc afin de pouvoir diviser par deux le nombre de porcs.

##### Raffinement

La chirurgie est bien tolérée par les animaux car le protocole d'anesthésie et d'analgésie a été mis au point afin d'éviter toute souffrance. La chirurgie est effectuée par un chirurgien expérimenté. Le suivi est facilité par un scoring qui reflète l'état de l'animal et qui permet facilement de prendre la décision d'arrêt de la procédure pour l'animal. Enfin, la durée d'observation de l'animal a été réduite au minimum afin d'observer la lésion effectuée.

##### Remplacement

Les mises au point des techniques HIFU et Doppler ont été évaluées au préalable in silico et testées ex vivo ce qui a permis de repousser le passage à l'animal. Les organes non prélevés dans ce projet seront proposés à d'autres chercheurs pour la réalisation de test ex vivo.

**20246** Le but de notre équipe est de générer et caractériser des modèles souris de maladies musculaires humaines (myopathies) et de tester d'éventuelles améliorations du phénotype grâce à différentes approches de thérapie génique. Notre travail est principalement axé sur les maladies génétiques affectant les muscles et plus particulièrement les myopathies centronucléaires (CNM) qui sont un groupe de myopathies congénitales sévères, caractérisées par une importante faiblesse musculaire. Les myopathies centronucléaires sont souvent présentes/déclarées dès la naissance ou au début de l'enfance, résultant d'une faiblesse musculaire sévère, d'une hypotonie et d'un décès précoce. Aucun traitement efficace n'existe pour les patients à l'heure actuelle. Pour comprendre comment les mutations génétiques sont responsables de ces pathologies, nous avons, dans un premier temps, utilisé des modèles cellulaires. Nous planifions maintenant d'utiliser des souris pour comprendre à la fois la physiologie et la physiopathologie dans un organisme vivant.

Dans notre équipe, des études d'injections intramusculaires d'AAVs (Virus Adéno Associé) ont déjà été menées avec succès sur des souris myopathes avec une amélioration notable du phénotype de la souris, notamment la force musculaire. En effet, ces vecteurs de transfert de gènes possèdent un fort potentiel thérapeutique.

Dans cette nouvelle étude, nous nous proposons d'injecter par voies intraveineuses (veine de la queue de la souris ou veine vitteline) des AAVs couplés à une protéine fluorescente GFP (green fluorescent protein) dans une femelle gestante sauvage (le premier jour de la gestation = P0). Ceci afin de vérifier la capacité de ces AAVs à traverser la barrière placentaire (pour l'injection via la

queue) et donc à passer dans le système sanguin des embryons de souris (pour les 2 types d'injection). Si tel est le cas, ceci permettrait, à l'avenir, de traiter les souris malades in utero afin d'éviter ou d'atténuer notablement les phénotypes musculaires sévères dès la naissance. Sachant que chez l'Homme les traitements postnataux sont coûteux et durent souvent toute la vie, ces techniques d'injections prénatales seraient une solution de traitement pour certaines myopathies, dans notre cas.

Le modèle choisi pour cette étude est la souris car des études précédentes ont été réalisées sur des modèles cellulaires qui ne permettent pas d'évaluer une amélioration du phénotype musculaire. (REPLACEMENT)

Pour valider ces modes d'injections, nous utiliserons un nombre minimum de souris par type d'AAV à tester, à savoir 2 souris par type (5 différents) car il s'agit d'une étude pilote (REDUCTION)

Tout inconfort de la souris détecté durant la gestation ou la mise bas sera traité en fonction des symptômes détectés. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant des mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront euthanasiés prématurément si nécessaire). Durant les expériences, les souris seront anesthésiées sous isoflurane et analgésiées par métacam (pendant et après la procédure) et de l'ocrygel sera appliqué dans les yeux pour prévenir le dessèchement oculaire. (RAFFINEMENT)

Nous injecterons 5 types d'AAVs différents (via la veine de la queue) pour deux femelles gestantes et pour deux fonds génétiques différents (5 X 2 X 2): 20 femelles gestantes adultes seront donc nécessaires. Nous rajouterons 4 femelles (deux par fond) pour tester l'efficacité de la VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) sur un seul type d'AAV. La VEGF est une puissante cytokine de croissance angiogénique. Elle stimule la prolifération et la survie des cellules endothéliales favorisant ainsi l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire. Ceci permettrait donc potentiellement d'améliorer le "passage" des AAVs à travers la barrière placentaire. Nous cherchons ici à tester l'efficacité de la VEGF et non la spécificité avec un sérotype d'AAV; c'est pourquoi nous ne testerons qu'un seul sérotype dans cette étude pilote. Au total, nous aurons besoin de 24 femelles gestantes.

Pour l'injection dans la veine vitelline, nous testerons sur 24 embryons (issus de 4 femelles gestantes avec une moyenne de 6 bébés par portée :  $4 \times 6 = 24$ ) pour un seul type d'AAV soit 28 animaux (4 femelles + 24 embryons = 28). Pour cette étude, 52 souris ( $24 + 28 = 52$ ) seront donc nécessaires au total.

**20247** La fonction du cerveau repose sur une communication efficace et contrôlée de différents réseaux neuronaux. Cette communication repose sur la connectivité entre diverses régions du cerveau, dont la base est une activité coordonnée des neurones. De nombreuses maladies neurodégénératives sont caractérisées par une activité neuronale anormale, suivie par la perte de connectivité entre les neurones, et neurodégénérescence. Un signe précoce de ces aberrations sont des anomalies de comportement, qui se présentent souvent avant même l'apparition de la neurodégénérescence.

Le cytosquelette, ou squelette des cellules, joue un rôle essentiel dans le développement et le maintien des fonctions des neurones. Les perturbations du cytosquelette sont souvent associées à la mort neuronale, et donc à la neurodégénérescence, aussi bien chez la souris que chez l'homme. On commence également à apprécier le rôle clé du cytosquelette dans le contrôle de l'activité neuronale.

Étant donné que les perturbations de l'activité et connectivité neuronales peuvent se manifester dans leurs phases initiales par des aberrations de comportement, et que les dérèglements du cytosquelette mènent aux aberrations de l'activité neuronale et la neurodégénérescence, nous proposons d'interroger comment les changements du cytosquelette neuronal impactent sur le comportement des animaux.

Le but de cette étude est d'identifier la régulation du cytosquelette neuronal comme un élément essentiel dans le contrôle du comportement de l'animal. Nous allons pour cela utiliser des animaux

transgéniques présentant des anomalies du cytosquelette et analyser leur comportement en fonction de l'âge. Nous évaluerons leurs fonctions cognitives, la mémoire et leurs capacités d'apprentissage, une étude qui ne peut être faite que sur les animaux de laboratoire. Pour cela, nous allons utiliser le système IntelliCage®, qui permet d'analyser le comportement des animaux dans le contexte social. Nous analyserons en tout 960 souris, et les animaux seront testés pendant environ 3 semaines à 3-9-15-21 mois. L'environnement des IntelliCages permet de minimiser les relations de dominance entre les animaux, ce qui participe à améliorer le bien-être animal.

Cette étude comportementale ne peut s'effectuer que sur des animaux, mais l'utilisation des IntelliCage® permet 1) une optimisation du nombre d'animaux testés, l'automatisation des cages supprimant le risque d'erreurs dues au manipulateur et 2) une réduction du stress de ces animaux grégaires puisque, grâce aux puces électroniques, ils sont testés ensemble dans une même cage.

En conclusion, dans cette étude nous respectons le principe des 3R :

**Remplacement** : nous nous basons sur les résultats publiés, et avons généré des données préliminaires dans les neurones en culture, ce qui nous a emmené à devoir avoir le recours aux modèles animaux.

**Réduction** : Ce projet est conçu de manière à réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, en utilisant les protocoles qui génèrent des données hautement reproductibles (forte réduction de différences liés à l'expérimentateur).

**Raffinement** : Notre protocole permet également de raffiner l'analyse du comportement animal, en réduisant le niveau de stress des animaux, vu que les tests sont conduits dans la cage d'hébergement.

**20248** Mots clés : cancer, immunothérapie, immuno-oncologie

Type de recherche : recherche translationnelle

**But du projet** : Un nombre croissant d'observations réalisées chez les patients illustrent l'importance du système immunitaire dans l'efficacité des traitements, notamment pour celle des anticorps thérapeutiques. Les anticorps thérapeutiques sont des protéines capables de se fixer sur une protéine présente à la surface d'une cellule immunitaire. Dans le projet qui nous intéresse, la fixation de l'anticorps sur sa cible empêche les cellules tumorales d'endormir la cellule immunitaire, ce qui maintient le système immunitaire actif et apte à lutter contre la tumeur.

Le projet présenté vise à étudier la réponse immunitaire antitumorale induite par des anticorps thérapeutiques, chez des souris immuno-compétentes porteuses de modifications génétiques. Ces modifications génétiques permettent l'expression de protéines-cibles humaines, à la surface des cellules immunitaires des souris. Ces protéines sont les cibles d'anticorps thérapeutiques utilisés en oncologie. Grâce à ces modifications, il est possible d'utiliser en préclinique le même anticorps qui sera utilisé chez l'homme. Cela permet de mieux analyser, comprendre et optimiser l'effet antitumoral des anticorps thérapeutiques lors des étapes précliniques chez la souris, et donc de sécuriser le passage chez l'homme lors des phases cliniques. Le but du projet est de valider l'intérêt préclinique des modèles transgéniques choisis. Ces modèles de souris ne peuvent pas être évalués *in vitro* car leur caractérisation nécessite un système immunitaire complet.

Dans le projet présenté, nous utiliserons une lignée de cancer colorectal non métastatique, implantée en sous-cutané. Nous vérifierons dans un premier temps la bonne prise tumorale de ces cellules tumorales chez les souris génétiquement modifiées, avant d'évaluer l'efficacité des anticorps thérapeutiques d'intérêt. Ils seront administrés par injection intrapéritonéale chez les souris après implantation du modèle de cancer colorectal.

Ce projet de recherche translationnelle nécessitera un maximum de 92 souris sur deux ans. Il comprend deux procédures de classe de gravité modérée.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

**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).

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.

**20249** La fertilité représente un enjeu majeur de santé publique. Un des effets secondaires importants des chimiothérapies chez les personnes atteintes de cancer, notamment les enfants pré-pubères, est l'atteinte du stock de cellules souches germinales, qui assurent le maintien du testicule et sa régénération tissulaire tout au long de la vie, et les problèmes d'infertilité qui en découlent. Il est possible d'envisager pour les enfants traités par chimiothérapie et dont il est impossible de préserver le sperme par cryoconservation, soit des stratégies de thérapie cellulaire par transplantation autologues (du même individu) de ces cellules souches, soit des greffes autologues de tissu testiculaire cryopréservé.

Notre projet a pour but d'identifier les cellules souches germinales (spermatogonies) dans les modèles murins et humains pour connaître les mécanismes moléculaires gouvernant leur auto-renouvellement. Il devrait permettre à terme le développement de protocoles de thérapie cellulaire pour traiter des cas d'infertilité, ainsi que l'évaluation des effets des traitements anticancéreux sur les cellules souches germinales humaines dans l'objectif de minimiser les effets secondaires et le risque d'infertilité associé.

Afin d'atteindre ces objectifs, nous réaliserons d'une part des transplantations testiculaires dans une souris receveuse, pour valider *in vivo* le caractère souche des cellules transplantées. Cette fonctionnalité sera établie grâce à la reprise d'une spermatogénèse normale grâce aux spermatogonies transplantées. En parallèle, nous développerons un modèle de xénogreffe de biopsies testiculaires humaines dans des testicules de souris immunodéficientes. Ces fragments de pulpe testiculaire seront issus de prélèvements réalisés dans un contexte de préservation de la fertilité de patients prépubères et adultes.

Toutes les expériences sont conçues dans le respect du principe des 3R pour l'utilisation des animaux en recherche (Remplacement, Réduction et Raffinement).

- Remplacer : Ce projet ne peut pas être complètement réalisé *in vitro* car aucun modèle d'organoïde testiculaire n'est disponible à l'heure actuelle. La transplantation de cellules souches germinales ou la xénogreffe de biopsie testiculaire chez une souris receveuse demeurent les seules façons de valider la capacité de ces cellules ou ces tissus à restaurer une différenciation normale en conditions physiologiques et à étudier *in vivo* l'influence de la niche somatique sur les cellules souches germinales. Ces modèles sont indispensables pour valider les étapes précliniques.

- Réduction : Des groupes de 10 souris, restreint à minima (grâce aux précédents travaux de l'équipe sur les procédures utilisées), seront transplantés ou greffés, puis les analyses comparatives seront validées par des tests statistiques classiques. Au total, ce projet nécessitera au maximum 500 souris sur une période de 5 ans. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des expériences *in vitro* seront d'abord menées avant de les valider *in vivo*.

- Raffinement : Les animaux seront hébergés en groupe sociaux dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress (tunnels en carton et nid végétal). Toutes les procédures seront pratiquées sous anesthésie, avec une prise en charge de la douleur pré et postopératoire. Les animaux seront observés tous les jours et des points limites bien établis seront mis en place afin d'éviter la douleur animale et entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Le développement de ce modèle permettra d'étudier l'effet des traitements anticancéreux (chimiothérapie) sur l'intégrité génétique et fonctionnelle des cellules souches germinales humaines, ainsi que sur la fonctionnalité du microenvironnement testiculaire.

**20250** Dans le cadre d'une étude internationale, nous allons former un(e) étudiant(e) à des techniques dont nous avons l'expertise afin qu'il/qu'elle puisse mener les études décrites dans le programme dans son laboratoire d'origine. La formation sera faite sur un modèle de rétinopathie pigmentaire autosomique dominante chez le rat.

Nous allons la former à une technique d'injection intraoculaire (qui permettra d'administrer à l'animal les thérapeutiques nécessaires), des techniques d'imageries de l'œil (qui permettront de visualiser l'état et la structure de la rétine) et des électrorétinogrammes (pour l'évaluation de la fonction rétinienne).

Au total un maximum de 35 rats seront nécessaires à cette formation

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105 :

Remplacer : La formation ne peut être dispensée sur des modèles *in silico*.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé sera le minimum nécessaire à l'apprentissage des techniques.

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 (cages de stabulation avec enrichissement, nourriture et boisson à volonté). Ils bénéficieront, si besoin, d'une anesthésie générale. Pour les injections intraoculaires, une anesthésie préalable de la cornée sera réalisée. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance adaptée des animaux en fonction des points limites définis à chaque procédure afin de s'assurer de leur bien-être.

Des critères d'arrêt (points limites) ont été déterminés pour chaque procédure expérimentale.

Les animaux en provenance de l'extérieur observeront une période d'acclimatation de 5 jours minimum.

**20251** 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'années, 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 (capacité du cerveau à remodeler ses connexions en fonction de l'environnement et des expériences vécues par l'individu). 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 murins incluront 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 FRET (une technique basée sur le transfert



de fluorescence) pour le lactate neuronal et astrocytaire, et par l'utilisation d'électrodes enzymatiques pour le lactate extracellulaire.

L'objet de la présente saisine est de confronter les méthodes de références (FRET et électrodes enzymatiques) aux mesures RMN *in vivo* chez des souris, dans deux modèles murins où l'on s'attend à des modifications des niveaux de lactate dans les différents compartiments (neurones, astrocytes et milieu extracellulaire). L'ensemble des procédures nécessitera 246 souris sur une durée maximale de 5 ans, ce qui constitue le minimum nécessaire afin de mener à bien les développements avec une précision suffisante (de 10 à 15 animaux par groupe, selon les techniques de mesure utilisées). Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire pour permettre une interprétation statistique fiable des résultats. 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 murins 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.

**20252** La cécité est source d'handicap grave. Elle peut être acquise suite à un accident mais dans la majorité des cas elle survient dans le cadre d'une maladie causée par la déficience ou le mauvais fonctionnement d'une protéine essentielle. C'est le cas de la mutation du gène *rdh12*, qui peut être responsable du développement de l'amaurose congénitale de Leber. Le gène *rdh12* code une enzyme essentielle pour l'élimination des produits toxiques générés par l'activité visuelle. Un dysfonctionnement de ce gène entraîne une cécité très précoce chez les enfants. Les médicaments conventionnels n'ont que peu d'utilité et le seul traitement envisageable actuellement est de pallier cette déficience via l'administration exogène de la protéine RDH12 en transférant son gène, permettant ainsi une expression continue de la protéine au sein des cellules cibles.

Dans ce projet, nous tenterons de remédier à la déficience du gène *rdh12* par une thérapie de remplacement de gène. Le traitement consiste en une unique injection intraoculaire d'un vecteur transporteur du gène thérapeutique. Pour cette étude nous utiliserons un modèle murin (souris) chez lequel le gène *rdh12* est déficient. Suite au traitement, l'acuité visuelle des animaux sera évaluée par des tests comportementaux, l'état et la structure de la rétine sera visualisée à l'aide de techniques d'imagerie non invasive de l'œil, et la fonction rétinienne sera étudiée par des électrorétinogrammes.

Nous utiliserons des souris normales pour les contrôles.

Au total 470 animaux seront nécessaires pour cette étude.

Conformément à la « règle des 3R » décrite au 2° de l'article R214-105 :

Remplacer : Ces traitements ne peuvent être testés qu'*in vivo* car les propriétés pharmacologiques du traitement ne peuvent être évaluées que dans des conditions physiologiques

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé dans ce projet a été évalué en fonction de l'expérience de l'équipe sur les techniques utilisées dans ce projet. Il tient compte des possibles pertes au cours de l'étude et 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 (cages de stabulation avec enrichissement, nourriture et boisson à volonté). Ils bénéficieront, si besoin, d'une anesthésie générale. Pour les injections intraoculaires, une

anesthésie préalable de la cornée sera réalisée. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Elle permettra une surveillance adaptée des animaux en fonction des points limites définis à chaque procédure afin de s'assurer de leur bien-être.

Des critères d'arrêt (points limites) ont été déterminés pour chaque procédure expérimentale.

Les animaux commerciaux observeront une période d'acclimatation de 5 jours minimum.

**20253** Le cancer colorectal (CCR) figure au troisième rang des cancers les plus diagnostiqués dans le monde. Il représente la quatrième cause de décès et son incidence continue à augmenter. Malgré l'ampleur de cette pathologie les origines moléculaires de cette maladie restent encore mal comprises. En conséquence, un grand nombre de patients ne peuvent être efficacement soignés. Au cours de la progression tumorale, les cellules cancéreuses acquièrent des propriétés spécifiques, dont la capacité à envahir les tissus environnants pour métastaser vers des sites distants. L'acquisition de ces propriétés malignes reflète des perturbations dans les voies de signalisation cellulaires qui contrôlent la prolifération, la motilité et à la survie cellulaire. En particulier, la signalisation régulée par les tyrosines kinases joue un rôle essentiel dans le contrôle de ces propriétés cellulaires. Notre recherche vise à comprendre comment la dérégulation de ce mécanisme moléculaire conduit à l'agressivité des cancers. La découverte de nouvelles cibles moléculaires est d'un intérêt thérapeutique majeur, et pourrait constituer des marqueurs diagnostiques ou pronostiques ainsi que des nouveaux traitements anti-cancéreux. Les modèles animaux de cancer colorectaux constituent des outils importants pour étudier et comprendre le développement du CCR. Ces modèles sont utilisés pour appréhender les mécanismes physiopathologiques. Ils reproduisent la biologie de la tumeur qui est observée chez l'homme ce qui permet de développer des traitements contre le CCR humain et permettent aussi d'évaluer la réponse tumorale à de nouvelles stratégies chimio-protectrices et thérapeutiques.

Nous souhaitons comprendre l'implication des différentes protéines liées aux voies de signalisation cellulaires contrôlée par les tyrosines kinases dans l'épithélium du colon et du système immunitaire associé, ainsi que leur contribution dans le développement du CCR par une approche de physiologie intégrative. Pour cela nous inactiverons le gène *Mpz1* et *Slap1* de façon ciblée dans des modèles murins reproduisant la carcinogenèse du colon. Notre programme de recherche qui se déroulera en 5 ans permettra le développement d'une nouvelle thérapie ciblant le microenvironnement des tumeurs colorectales.

Dans le cadre du bien-être animal, nous respecterons la règle des 3R:

**REPLACER** : Nous utiliserons le modèle *ex vivo* (organoides) issus de l'épithélium intestinal pour étudier le caractère autonome des modifications génétiques dans les cellules épithéliales intestinales. Par contre, il n'existe pas d'alternative autre que l'utilisation d'animaux génétiquement modifiés pour évaluer avec précision et pertinence, le rôle physiopathologique des nouveaux gènes de notre étude dans le dialogue qui peut se mettre en place entre les cellules tumorales et les cellules de l'environnement. Nous utiliserons le modèle souris *mus musculus*, permettant l'inactivation de manière tissu-spécifique et inductible des gènes d'intérêt.

**REDUIRE** : Selon nos études précédentes, les données de la littérature et des analyses statistiques, nous pouvons définir avec précision le nombre de souris suffisant par groupe pour chaque procédure. L'utilisation des deux sexes permet de réduire au maximum le sacrifice d'animaux car nous multiplions par 2 le nombre d'animaux d'intérêt produit dans nos lignées transgéniques. L'utilisation d'un animal dans plusieurs procédures réduit également le nombre de souris à utiliser.

**RAFFINER** : Toutes les dispositions ont été prises pour le raffinement des conditions d'élevage et d'expérimentation. Le bien-être animal est évalué quotidiennement. Une attention particulière est portée à la formation de l'expérimentateur afin de limiter la durée de la procédure expérimentale et ainsi réduire la douleur et limiter les variations expérimentales. Une fiche de suivi est établie pour chaque animal de la procédure expérimentale. Les souris seront observées régulièrement et les signes cliniques seront recherchés : perte de poids, diarrhée, isolement, dos voûté. A l'apparition d'un de ces signes, des stratégies seront mises en place pour mettre fin à la douleur et à l'angoisse.

de l'animal. Si les animaux ne se nourrissent pas convenablement, de la nourriture gélifiée sera placée dans la cage afin de faciliter la réhydratation. Pour certaines procédures, l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques sera envisagée. Pour mettre fin à la douleur et aux angoisses intermédiaires nous mettrons en place des améliorations environnementales (ajout d'enrichissement de type nid plastifié...).

Les modèles d'induction de tumorigenèse colique impliquent à la fois l'utilisation de traitements chimiques et de modèles génétiquement modifiés. Ces modèles sont phénotypiquement dommageables mais bien caractérisés ce qui permet de repérer les signes de douleur et de bien définir les critères d'arrêt. Cette étude représente l'utilisation de 2556 animaux pour 11 lignées de souris, soit une moyenne de 232 animaux par lignée.

**20254** Les récents progrès techniques ont fait faire un bond en avant dans la modélisation numérique basée sur l'imagerie scanner de patients ; il est maintenant envisageable d'obtenir des modèles prédictifs. Dans ce projet, il s'agit de prédire le risque de fracture d'os avec métastases osseuses. Les propriétés mécaniques de l'os sont maintenant bien connues, et on peut aisément simuler le comportement de l'os soumis à un chargement. On peut ainsi simuler si un os a un risque de fracture dans le cas d'une chute. Cette prédiction est beaucoup plus compliquée dans le cas d'os « malade », notamment d'os atteint de métastases osseuses, car les propriétés mécaniques de ces métastases ne sont pas encore connues et ne peuvent pas être estimées par imagerie scanner. La connaissance de ces propriétés permettrait de les implémenter dans le modèle numérique et fournir un outil d'aide à la décision aux cliniciens pour savoir si une prise en charge chirurgicale est nécessaire. En effet, bien évaluer le risque fracturaire et déclencher une opération à bon escient représente un enjeu capital dans la prise en charge des patients avec métastases.

Notre but ici est de caractériser les propriétés viscoélastiques des tissus par Microscopie à Force Atomique (AFM, technique adaptée aux échantillons de petite taille : diamètre  $\geq 5\text{mm}$ ) en utilisant un modèle murin de xénogreffe sous-cutanée (cellules tumorales de sein et poumon). Ensuite, de comparer les propriétés mécaniques viscoélastiques (rigidité et élasticité) de tumeurs et de tissus mous sains.

Nous utiliserons des souris Balb/c nude, qui ont une déficience en lymphocytes T permettant l'injection de cellules tumorales humaines. Les animaux seront soumis à une procédure expérimentale d'une durée de l'ordre de 30 jours (selon le développement tumoral). Les conditions d'entretien des souris seront spécifiques aux souris à phénotype dommageable. Nous utiliserons pour ce projet le modèle de tumeur sous-cutanée, qui est peu invasif et reproduit les caractéristiques des tumeurs de sein et poumon. Les cellules tumorales seront injectées au niveau du dos de la souris. Ces cellules survivent et croissent, conduisant à la formation d'une tumeur.

Une étude pilote utilisant  $2 \times 10$  souris sera conduite afin de vérifier et valider le développement tumoral et identifier les éventuels points limites précoces dans deux lignées cellulaires. Des cellules tumorales de sein (pilote 1) ou de poumon (pilote 2) seront injectées en sous cutanée afin de créer une masse tumorale, qui après résection, permettra de caractériser leurs propriétés mécaniques. Puis, les paramètres optimaux de l'étude pilote conduiront à l'expérimentation sur deux groupes de dix souris des mêmes lignées. Nous utiliserons donc un total de 40 souris.

Tout au long de l'étude, un examen quotidien des souris sera effectué pour identifier les éventuels dommages causés aux animaux et prendre les mesures nécessaires pour les atténuer. Nous suivrons l'apparition et la croissance de la tumeur par palpation, mesure au pied à coulisse et analyse de la bioluminescence une fois par semaine, puis tous les deux jours quand la tumeur aura atteint un diamètre de 4 mm. Nous vérifierons que les tumeurs ne sont pas nécrotiques, que la perte de poids ne dépasse pas 10% par semaine, qu'il n'y a pas d'ulcération de la peau au niveau de la tumeur. Cependant, avec une tumeur d'un diamètre de 5 mm sur chaque axe (valeur minimale permettant la caractérisation des propriétés mécaniques par AFM), le risque de nécrose ou ulcération est faible. En fin de protocole, les souris seront sacrifiées par dislocation cervicale avec sédation préalable, puis la tumeur sous cutanée ainsi que des tissus sains (peau, muscle, tissu adipeux) seront prélevés pour la caractérisation des propriétés mécaniques (rigidité, élasticité) par

AFM. Notre hypothèse est que les propriétés viscoélastiques des tumeurs sont différentes de celles des tissus sains environnants.

Le projet sera conduit selon les règles d'expérimentation des 3R.

**Remplacement :** Notre objectif est de caractériser les propriétés mécaniques de tumeur. Nous utiliserons 2 lignées cellulaires de carcinomes mammaires ou pulmonaires humaines. Pour que le tissu formé soit le plus fidèle possible à une tumeur se développant naturellement chez l'humain, nous avons besoin d'un agglomérat cellulaire contenant des cellules dans une matrice. L'étude ne peut donc pas se faire *in vitro* sur les cellules isolées, ni sur des cellules cultivées dans un biomatériau, car le choix de ce biomatériau (notamment de ses propriétés mécaniques) aurait une influence sur les propriétés mécaniques du tissu formé. L'injection de cellules tumorales en sous cutanée conduit à la formation d'une matrice représentant une tumeur ; c'est donc un modèle adapté pour notre objectif.

**Réduction :** Une analyse de puissance a permis de déterminer la taille des groupes nécessaire : nous utiliserons 20 souris (10 par type cellulaire) pour conduire une étude pilote qui nous permet de vérifier et valider le développement tumoral et ainsi optimiser les conditions expérimentales. Cette étude pilote permettra également d'estimer la variation des paramètres mécaniques pour chaque groupe, et ainsi d'affiner le nombre d'animaux nécessaires dans chaque groupe expérimental (2 groupes avec 10 souris par groupe).

**Raffinement :** Tout élément rentrant en contact avec la souris est stérile. Le change de la litière et de la cage s'effectue une fois par semaine par le personnel compétent de l'animalerie. Lors de l'injection des cellules tumorales, les souris seront anesthésiées sous isoflurane et un gel anesthésiant de lidocaïne sera placé sur le dos des souris. Lors de l'anesthésie, la température des animaux sera maintenue par des coussins chauffants. L'état de bien-être des animaux sera évalué quotidiennement à l'aide d'une fiche de suivi clinique. Suivant le type de dommage et afin de garantir le bien-être animal, les souris pourront être (1) isolées dans une nouvelle cage en vue de leur apporter les soins adaptés, (2) observées plusieurs fois par jour, (3) traitées avec de la rimadyl (carprofène) associée si besoin à la buprénorphine en cas de signe de douleur (posologie adaptée en fonction de la sévérité des signes), et (4) euthanasie si pas d'amélioration au bout de 24h.

L'observation de signes de douleur ou de mal être (prostration, perte de poids) entraînera la sortie du protocole de l'animal.

**20255** La polykystose rénale (PKR) est une maladie génétique héréditaire qui se traduit par l'apparition croissante de kystes sur les reins entraînant peu à peu leur dysfonctionnement allant jusqu'à l'insuffisance rénale terminale qui nécessite une dialyse rénale ou une greffe. Il s'agit d'une des maladies génétiques rénales les plus fréquentes et elle touche, en France, plus de 60 000 personnes. Une molécule originale, issue d'une source naturelle et déjà testée chez le rat, semble être un candidat thérapeutique pour cette maladie. En outre, cette molécule provoque une augmentation de la diurèse (volume d'urine sécrété par les reins pour une durée donnée). L'objectif principal de ce projet est de déterminer la dose efficace de cette molécule qui augmente la diurèse cinq fois par rapport à son niveau basal chez le mini-porc. L'objectif secondaire est de mesurer les modifications de différents marqueurs rénaux et hépatiques afin d'évaluer la toxicité de la molécule chez cette même espèce. Des études *in vivo* ont déjà été conduites chez le rat et la souris et ont permis de mieux comprendre le comportement de cette molécule. Ainsi, seulement trois doses croissantes seront évaluées successivement pour répondre aux objectifs de cette étude. Dans une optique de réduction du nombre d'animaux utilisés, pour chaque dose seuls deux animaux, un mâle et une femelle, seront utilisés, soit un total de six individus pour le projet. En outre, chaque animal est son propre témoin ce qui limite le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux objectifs du projet. L'efficacité et la toxicité de telles molécules ne peuvent être confirmées que dans des modèles pré-cliniques, c'est pourquoi il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux vivants dans ce projet. Dans une optique de raffinement, les mini-porcs arrivent sur place deux semaines et demie avant le début des manipulations pour leur permettre de s'habituer au lieu, aux manipulations et au personnel, et ainsi de diminuer leur stress. Afin de respecter leur comportement

grégaire, ils sont logés par lot de trois selon leur sexe à leur arrivée dans des boxes adjacents, agrémentés de jouets et sur une litière de paille ou de copeaux de bois leur permettant d'exprimer leur comportement de fouissement. Pour les besoins du projet, ils sont ensuite isolés, mais l'organisation des boxes et des cages leur permet toujours de voir ou d'entendre au moins un autre individu. En cas de température inférieure à 10 degrés dans l'animalerie, un système de chauffage individuel est activé. De plus, le personnel animalier observe régulièrement le comportement des animaux afin de repérer d'éventuels signes de mal-être ou de souffrance. Ces signes inhabituels sont immédiatement signalés au responsable de l'expérimentation. Ce suivi a lieu deux fois par jour pendant la période d'acclimatation, puis quatre fois par jours dans les trois jours suivant l'administration de la molécule. En outre, la surveillance des animaux est permanente dans les douze heures suivants l'administration. 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. En outre, l'expérience acquise lors des essais *in vivo* précédents permet de mieux cibler les éventuels effets indésirables qui pourraient survenir sur les animaux.

**20256** Le cancer représente la deuxième cause de mortalité dans les pays développés. En dépit de l'amélioration constante de la prise en charge des patients, de nombreux progrès restent à faire et de nombreux travaux sont actuellement menés afin de mettre sur le marché de nouveaux traitements thérapeutiques anti-tumoraux. Tout nouveau traitement entrant en essai clinique chez l'Homme, doit au préalable avoir démontré son efficacité thérapeutique potentielle lors d'études précliniques. Notre expertise permet aux développeurs de médicaments d'avoir accès à des modèles innovants de cancers afin d'identifier les traitements potentiellement efficaces en clinique. Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines greffées sur souris ou PDX pour Patient Derived tumor Xenografts. Ces modèles développés au cours des dernières années sont donc des souris porteuses d'une tumeur humaine. Ce sont actuellement les seuls qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des cancers humains. Nous disposons actuellement d'une collection de plus de 150 PDX différentes représentatives des grands sous-types de tumeurs solides.

L'objectif de ce projet est d'obtenir une preuve de concept de l'efficacité anti-tumorale de traitements innovants (petite molécule, anticorps monoclonaux, conjugués anticorps-médicament, protéines thérapeutiques), par le biais d'une étude exploratoire avec des petits effectifs d'animaux par groupe, dont le paramètre principal d'évaluation de l'efficacité antitumorale est la régression tumorale et le ralentissement de la vitesse de croissance tumorale sous traitement.

Concernant la règle des 3Rs,

Remplacement : Si l'efficacité antitumorale des traitements innovants est testée, dans un premier temps, lors d'essais *in vitro* sur des lignées cellulaires et/ou des organoïdes, seules les études sur des modèles de PDX permettent d'étudier tous les paramètres observables, depuis l'administration jusqu'à l'élimination des traitements administrés, en prenant en compte la métabolisation du traitement, les interactions possibles avec les cellules non-tumorales de l'organisme, ainsi que les interactions avec les autres organes du corps. A ce jour, seul l'animal permet d'étudier cette complexité environnementale.

Réduction : Les modèles de PDX utilisés sont parfaitement maîtrisés et permettent de n'utiliser que le nombre strictement nécessaire d'animaux pour obtenir des résultats pertinents. Les traitements retenus pour ce projet sont sélectionnés au préalable lors d'études *in vitro* permettant de n'étudier que ceux qui auront préalablement démontré une efficacité *in vitro*. Plusieurs traitements au sein d'une même procédure expérimentale, sur un même modèle tumoral (1 seul groupe contrôle pour plusieurs traitements différents), pourront être administrés et ainsi réduiront le nombre total d'animaux inclus dans le projet.

Raffinement : l'expérience acquise lors d'études antérieures nous permet d'optimiser les doses potentiellement efficaces et minimise les effets secondaires. Les animaux sont acclimatés au moins 7 jours avant d'être greffés, puis sont greffés sous anesthésie chimique (mélange d'anesthésique et de tranquillisant). Outre la surveillance quotidienne post-greffe, un contrôle mortalité/moribondité

7 jours/7 est réalisé, et les animaux sont examinés et pesés au minimum 2 fois par semaine afin de détecter et notifier tout signe de changement dans le comportement ou l'état de santé des animaux. En cas de signes cliniques observés et/ou de perte de poids, un examen clinique est réalisé quotidiennement et des actions visant à prévenir douleur ou angoisse comme par exemple interruption du traitement ou ajout de compléments alimentaires sont appliquées.

Le projet dont la durée sera de 5 années est constitué de 50 études visant à évaluer différents traitements innovants sur différents modèles de PDX. La procédure expérimentale définie dans ce projet comprend 115 animaux en moyenne et 180 animaux au maximum, soit un total de 9 000 animaux au maximum.

**20257** *Listeria monocytogenes* (Lm) est la bactérie responsable de la listériose, maladie humaine d'origine alimentaire. Lm peut atteindre le cerveau et induire des méningites et encéphalites, en particulier chez les personnes âgées de plus de 65 ans, avec un taux de mortalité d'environ 30 %. La listériose peut aussi se traduire par une infection materno-fœtale chez les femmes enceintes, provoquant fausses-couches, accouchements prématurés ou infections néonatales. Les mécanismes exacts ainsi que les gènes spécifiques de Lm lui permettant d'infecter le fœtus et le cerveau sont encore mal connus. De plus, les mécanismes expliquant la plus grande susceptibilité des personnes âgées à la neurolistériose ne sont pas connus.

Certains groupes de souches de Lm (appelés complexes clonaux), sont plus associés aux infections humaines, alors que d'autres, qui causent plus rarement des infections, sont principalement présents dans l'environnement ou la nourriture. Les souches des complexes clonaux associées aux infections humaines sont plus virulentes dans un modèle animal (souris). Nous cherchons à présent à déterminer les mécanismes moléculaires impliqués dans l'hypervirulence de ces complexes clonaux aux différentes étapes de l'infection : colonisation du tube digestif, traversée de la barrière intestinale, survie dans le compartiment sanguin ou les organes internes, traversée de la barrière hémato-encéphalique et traversée de la barrière placentaire. Nous cherchons aussi à déterminer pour ces étapes les différences liées à l'âge de l'hôte infecté.

Le bénéfice attendu de ce projet est de comprendre comment les souches hypervirulentes contournent les réponses de l'hôte pour induire une infection du système nerveux central et de l'unité fœto-placentaire. La caractérisation de ces mécanismes est déterminante pour la conception de stratégies thérapeutiques limitant la neurolistériose, en particulier chez les personnes âgées, et les conséquences dramatiques de l'infection materno-fœtale. Cette étude nous permettra aussi de mieux décrire la réponse immunitaire de l'hôte, qui pourra être utilisée pour le développement de vaccins dérivés de Lm ou pour la modulation de la réponse immunitaire intestinale (meilleure délivrance de traitements par exemple).

Le recours à l'animal est nécessaire pour cette étude, la réponse globale de l'hôte à une infection ne pouvant pas actuellement être modélisée *in vitro* dans toute sa complexité. Pour des aspects précis, des modèles de culture cellulaire ou d'organes recréés *ex vivo* (organoïdes, développés au laboratoire) pourront être utilisés.

L'estimation du nombre d'animaux utilisés permettra d'obtenir des résultats robustes et reproductibles. Elle correspond au nombre minimum nécessaire à un traitement statistique correct. Les animaux seront infectés avec un mélange comprenant les souches bactériennes à tester, exprimant une protéine rouge, en même temps que les souches bactériennes contrôle, exprimant une protéine verte. Les bactéries forment ainsi des colonies rouges ou vertes selon la souche, permettant de les différencier. Ceci permet de minimiser les variations entre individus, et de diviser le nombre d'animaux requis par 2.

Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Les expériences impliquant des actes de chirurgie seront réalisées sous anesthésie en présence d'analgésique. Tous les animaux seront suivis régulièrement au cours de l'expérimentation.

Les doses d'infection sont calculées pour induire une listériose sans entraîner le décès de l'animal. Certains effets néfastes sur les animaux pourront être observés suite à l'infection par Lm: poil

ébouriffé, saignements utérins. Le degré de sévérité restera modéré (dès que les animaux atteindront des points limites définis, ils seront mis à mort immédiatement).

Ce projet nécessitera 4551 souris, sur 5 ans, réparties en 12 procédures de classe modérée.

**20258** Le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) est répertorié comme étant un agent de bioterrorisme. Plusieurs espèces de moustiques sont compétentes pour transmettre le VFVR; ce sont des moustiques des genres *Culex* spp., *Aedes* spp. et quelques espèces d'*Anopheles* spp. L'intensification des échanges entre l'Europe et l'Afrique fait craindre l'importation de VFVR dans les pays européens. De plus, l'absence de vaccins humains et de traitements spécifiques rendent la situation encore plus préoccupante. Ainsi, développer de nouveaux vaccins et tester leurs effets protecteurs sont essentiels pour renforcer la gamme de mesures de lutte contre la fièvre de la vallée du Rift.

Nous proposons d'évaluer les effets protecteurs de candidats vaccins contre le VFVR dans un modèle murin. Dans ce but, nous proposons une seule procédure expérimentale qui est la suivante : des lots de souris OF-1 femelles (moins sensibles au stress social de la vie en groupe que les mâles) âgées de 4-5 semaines seront inoculés avec des candidats vaccins contre le VFVR, et les souris inoculées seront maintenues en animalerie et observées jusqu'à 14 jours après l'inoculation. Les souris seront ensuite challengées avec une souche virulente de VFVR, puis observées pendant 14 jours.

Le projet comprend une seule procédure. Le nombre total de souris testées est estimé à 105 souris. La conception de notre expérience est basée sur une publication de notre laboratoire qui nous permet de définir (i) la dose de VFVR injectée, induisant des symptômes observables chez la souris (perte de poids, changement de posture, perte d'activité), (ii) le mode d'infection, (iii) la durée d'observation, et (iv) l'âge des souris. Afin de limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'anxiété des souris, une grille de notation sera établie afin d'évaluer le temps précoce de l'infection et anticiper toutes mesures si nécessaire.

Pour déterminer les effets protecteurs des candidats vaccins contre le VFVR, il est essentiel de réaliser des tests sur des mammifères vivants, qui développent des réponses immunitaires similaires à celles de l'homme. Sur la base d'une analyse statistique, la taille de l'échantillon d'animaux est réduite au minimum pour garantir la validité des résultats. Pour réduire davantage le nombre d'animaux utilisés dans ce projet et pour fixer certains paramètres pour les expériences, nous nous baserons sur les résultats obtenus dans une étude précédente, qui a identifié tous les éléments critiques nécessaires au projet. Les signes de maladie et d'inconfort chez les animaux testés seront suivis et surveillés 2 fois par jour par un personnel qualifié. Si un ou plusieurs des points limites prédéfinis sont atteints, la souris sera mise à mort.

**20259** L'entérovirus 71 (EV71) est un virus strictement humain appartenant au genre des Enterovirus. Ce virus est actuellement considéré comme un virus émergent et cause, plus particulièrement chez les jeunes enfants, un syndrome mains-pieds-bouche (HFMD en anglais), caractérisé par l'apparition de lésions cutanées maculo-papuleuses et d'ulcérations muqueuses principalement sur ces sites. Cette maladie bénigne peut s'accompagner d'encéphalite parfois associée à un oedème pulmonaire souvent mortel. Ce virus, qui depuis environ 15 ans, est surtout présent dans divers pays d'Asie du Sud-Est, a émergé au Cambodge en avril 2012 où il a provoqué une épidémie avec une morbi-mortalité pédiatrique élevée.

A l'été 2012, un consortium de chercheurs s'est constitué afin de mener des recherches pour caractériser les isolats d'EV71 circulant au Cambodge et tenter d'expliquer leur pathogénicité.

Afin d'évaluer la virulence des isolats d'EV71 responsables d'encéphalite mortelle, nous avons identifié des lignées de souris sensibles à l'infection par ce virus. Nous avons montré que certains isolats associés à des encéphalites mortelles ont une virulence accrue, et révélé le rôle d'un facteur immunitaire dans la sensibilité à l'infection des jeunes souris.

Notre étude a pour but d'identifier les facteurs viraux de la virulence de l'EV71, ainsi que les facteurs de l'hôte jouant un rôle majeur dans la virulence de ce virus en utilisant la souris comme modèle animal. Ce modèle ne peut pas être remplacé par un modèle *in vitro* car il n'existe pas de système *in vitro* permettant d'étudier le rôle des acteurs immuns dans l'infection sévère, c'est-à-dire l'infection du système nerveux central et leur conséquence sur l'organisme, ni de révéler une différence de virulence entre les isolats. Les espèces de souris utilisées seront des souris présentant un déficit immunitaire (souris Rag2gC<sup>-/-</sup> et Interféron gamma knock-out, IFNg K/O) ou non (C57BL/6). L'infection de ces animaux par voie intra-péritonéale avec l'EV71 peut provoquer une maladie caractérisée par l'apparition d'un déficit moteur atteignant partiellement un ou plusieurs membres et se manifestant par une perte partielle des capacités motrices d'une partie du corps (appelée parésies) qui évoluent très fréquemment en paralysies pouvant être mortelles et qui témoignent d'une infection du système nerveux central. L'apparition des parésies est donc un critère de virulence pour un isolat et un critère de sensibilité pour une lignée de souris.

Ce projet se déroulera sur 5 ans et utilisera 1319 animaux au total, sachant que, pour chaque expérience, le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser des tests statistiques valides sera utilisé. Les animaux seront observés quotidiennement et le jour de l'apparition des premiers signes cliniques, parésies d'un ou plusieurs membres, sera noté puis l'animal sera mis à mort immédiatement afin d'éviter la souffrance provoquée par les paralysies qui surviennent très fréquemment dans les jours qui suivent les parésies.

L'identification des facteurs, du virus et de l'hôte, impliqués dans la virulence de l'EV71 permettra de comprendre les bases moléculaires de la pathogénicité de ce virus émergent, étape indispensable pour le développement d'une prophylaxie.

**20260** La sclérose latérale amyotrophique (SLA), ou maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative. Elle se déclare à l'âge adulte (40-80 ans) et évolue, en 3 à 5 ans, vers la paralysie complète et le décès du patient. Elle est causée par la mort des motoneurones (cellules contrôlant les mouvements du corps), entraînant un affaiblissement progressif et une atrophie des muscles. C'est la plus fréquente des maladies du motoneurone chez l'adulte. A ce jour, il n'existe pas de traitement contre la SLA car les mécanismes physiopathologiques sont méconnus. La SLA touche les deux sexes et son incidence augmente avec l'âge à partir de 40 ans. Elle peut dans certains cas être associée à des troubles cognitifs de type démence fronto-temporale (DFT). Dans une cohorte humaine de patients souffrant de la forme DFT-SLA, une mutation a été identifiée sur le gène d'une protéine mitochondriale. La mitochondrie est un petit organite indispensable dans les processus énergétiques cellulaires. Pour comprendre comment la mutation du gène mitochondrial peut conduire à la mort des motoneurones, un modèle murin porteur de la mutation d'intérêt a été généré. Ce modèle murin s'est révélé être un modèle reproductible de la pathologie observée chez les patients porteurs de cette mutation d'intérêt en développant une myopathie mitochondriale et des signes d'atteinte du motoneurone ainsi qu'une neuro-inflammation. De manière notable, cette souris est le premier modèle murin présentant une atteinte du motoneurone ayant pour origine une mutation au niveau d'un gène mitochondrial. Notre projet de recherche a pour but de comprendre comment un dysfonctionnement mitochondrial conduit à une atteinte du motoneurone et le rôle de la neuro-inflammation dans cette maladie. Pour répondre à cet objectif, nous voulons identifier et caractériser la séquence des événements reliant l'atteinte mitochondriale et l'atteinte neuronale dans ce modèle murin. Les organes seront récupérés après la mort de l'animal pour des analyses biologiques et biochimiques (analyses de l'atteinte mitochondriale et de marqueurs neuromusculaires...). La compréhension des mécanismes reliant l'atteinte mitochondriale à la dégénérescence des motoneurones est primordiale dans le but de développer une stratégie thérapeutique. Dans un but de remplacement, des expériences ont été réalisées précédemment sur des cellules en culture par nos collaborateurs. Les expériences réalisées sur des fibroblastes issus de patients porteurs de la mutation d'intérêt nous ont permis d'identifier de potentiels mécanismes impliqués dans les atteintes mitochondriale et neurodégénérative. Des expériences réalisées sur des cellules de patients reprogrammées vers l'état embryonnaire et ensuite différenciées vers les



cellules de l'organe d'intérêt présente un potentiel important pour remplacer et réduire l'utilisation de l'animal. Cependant, la pathologie touchant plusieurs organes, seul un modèle animal permettra de comprendre et d'étudier les conséquences multiples de cette mutation sur les mécanismes moléculaires conduisant aux atteintes mitochondriale et neurodégénérative.

Dans le but de comprendre les mécanismes à l'origine de la pathologie chez les patients, nous étudions le modèle DFT-SLA au cours du temps (état clinique) afin d'envisager des voies d'intérêt thérapeutiques dans l'avenir. De plus ces modèles souris représentent des outils de choix pour tester des molécules pharmacologiques afin de ralentir ou inverser les processus pathologiques. Deux procédures expérimentales de sévérité modérée seront mises en œuvre.

Un maximum de 720 souris sera utilisé pour ce projet, en fonds génétique C57BL/6N, qui se déroulera sur une durée de 5 ans. Dans un but de réduction du nombre d'animaux à utiliser pour cette étude, des statistiques prédictives ont été réalisées dans le but d'utiliser le minimum d'animaux nécessaires. Les animaux obtenus par élevage seront utilisés pour comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les atteintes mitochondriales et neurodégénérative. Dans un but de raffinement, l'utilisation d'une fiche d'observation détaillée (en lien avec le phénotype attendu de DFT-SLA) permettant un suivi optimal des animaux sera mise en place. L'observation des animaux permettra d'identifier précocement tout signe clinique, de stress ou de douleur. Puisque les souris porteuses de la mutation d'intérêt manifestent une cardiomyopathie dilatée progressive, nous suivrons la fonction cardiaque par échographie durant la durée de vie de l'adulte. Le phénotype de DFT-SLA étant associé à une perte de poids, les animaux seront pesés une fois par semaine. Lorsqu'une perte de poids sera observée, une surveillance accrue sera mise en œuvre, de l'eau et de la nourriture gélifiées seront également ajoutés dans la cage. Si, lors de la surveillance un stress est observé, un enrichissement de la cage sera mis en place et une surveillance accrue sera effectuée.

**20261** Le paludisme, responsable de plus de 400 000 décès par an, est la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde. Cette maladie est causée par un parasite appelé Plasmodium, dont il existe de nombreuses espèces. Malheureusement, à ce jour, aucun vaccin commercial hautement efficace n'est disponible pour lutter contre cette maladie insidieuse.

L'infection paludique comporte deux phases. La première, asymptomatique, suit la piqûre infectante par le moustique vecteur, et précède l'infection des globules rouges. Cette première phase consiste essentiellement en un cycle de multiplication dans le foie des quelques parasites injectés dans la peau par le moustique. Ce cycle de multiplication dans le foie génère la forme du parasite qui infecte les globules rouges. La seconde phase consiste en des cycles répétés de multiplication du parasite à l'intérieur des globules rouges et est responsable des symptômes et complications de la maladie. Les axes majeurs de notre recherche portent sur l'étude de la biologie et l'immunobiologie du parasite dans la première phase de l'infection afin de développer un vaccin. Notre but est (i) de mieux comprendre les premières étapes de l'infection en utilisant des approches de biologie cellulaire et moléculaire ainsi que la microscopie intra-vitale pour identifier les composants essentiels du parasite susceptibles de constituer des cibles pour de nouveaux médicaments et vaccins, (ii) de mieux comprendre comment une immunité protectrice contre le parasite peut se développer et d'identifier de nouvelles cibles vaccinales, et (iii) de développer un vaccin plus efficace contre le paludisme.

Les processus conduisant à l'infection de l'hôte par les différents stades parasitaires ou à la protection de l'hôte contre ces stades par le biais de la vaccination sont extrêmement complexes. Dans la phase initiale de l'infection, ils impliquent des interactions multiples et dynamiques entre le parasite et plusieurs types cellulaires dans la peau, les ganglions, les vaisseaux, le sang, la rate et le foie, qu'il est impossible de répliquer dans leur ensemble dans un système *in vitro*. L'étude approfondie de cette phase nécessite donc l'utilisation de modèles animaux pour appréhender cette incroyable complexité. Depuis les années 1950, les espèces de Plasmodium qui infectent les rongeurs, *P. berghei* et *P. yoelii*, sont devenues les espèces de choix pour étudier cette phase, et

ont notamment permis la découverte de deux des plus importants candidats vaccins contre le paludisme.

Une deuxième difficulté réside dans la production du stade parasitaire inoculé dans la peau de l'hôte par le moustique vecteur. Il n'existe pas actuellement de système qui permette de reproduire le cycle de vie complet de *Plasmodium in vitro*. Par conséquent, pour réaliser l'ensemble des études proposées, des infections hebdomadaires de souris et de moustiques sont nécessaires pour l'obtention de ce stade parasitaire.

Afin d'atteindre nos objectifs, nous estimons le nombre d'animaux de laboratoire auxquels nous aurons recours à environ 6252 souris sur 5 ans. 1730 animaux seront concernés par trois procédures de sévérité modérée (PE N°2,5,6) qui pourraient impliquer un acte chirurgical avec réveil. Les trois autres procédures (PE N° 1,3,4) mises en œuvre, classifiées légères, impliqueront 4522 rongeurs.

Si la production de nos parasites requiert le maintien du cycle parasitaire *in vivo* chez les animaux de laboratoire, nos expériences en revanche seront effectuées sur des modèles *in vitro* dès que cela est possible. De plus, nous utilisons et développons des techniques d'imagerie non invasives, qui permettent de diminuer le nombre de rongeurs utilisés dans nos protocoles expérimentaux longitudinaux. Dans le cas où l'utilisation de souris est inévitable, le nombre d'animaux utilisés par expérience est limité au minimum nécessaire estimé par un logiciel développé spécifiquement pour cela.

Nos points limites chez les souris infectées susceptibles au neuropaludisme (eg, C57BL/6 infecté avec *P. berghei* ANKA) sont établis de manière à éviter la phase symptomatique, caractérisée par des signes neurologiques, tels que la paralysie, l'ataxie et les convulsions, qui peuvent entraîner la mort de l'animal dans les 2 premières semaines suivant l'infection.

Des anesthésiques et des analgésiques seront utilisés lors d'interventions potentiellement douloureuses. De plus, nous suivons le comportement des animaux en utilisant une grille de signes cliniques permettant de détecter des problèmes de santé et d'intervenir au plus tôt pour améliorer rapidement leur bien-être.

**20262** La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant avec une prévalence d'environ 1 garçon sur 5 000 à la naissance. Elle est due à une mutation sur le gène *Dmd* situé sur le chromosome X qui code la protéine Dystrophine, indispensable au maintien de l'intégrité des fibres musculaires. L'absence de Dystrophine entraîne une fragilisation des muscles à chaque contraction et donc une dégénérescence musculaire progressive. La DMD se traduit dans un premier temps par une faiblesse musculaire importante des membres inférieurs, puis la faiblesse musculaire atteint les membres supérieurs. L'atteinte du diaphragme entraîne également une défaillance respiratoire. Avec le progrès de la prise en charge multidisciplinaire, l'espérance de vie des patients s'est considérablement allongée. Cependant, l'apparition inéluctable d'une cardiomyopathie dilatée, entraînant une insuffisance cardiaque, reste responsable d'une majorité de décès des patients avant l'âge de 30/40 ans. A ce jour, la prise en charge symptomatique et préventive de la défaillance cardiaque reste insuffisante pour obtenir une stabilisation de la maladie et il n'existe aucune solution thérapeutique satisfaisante. Il est donc primordial de développer un traitement pour l'atteinte cardiaque chez le patient DMD. La thérapie génique est une des approches prometteuses pour le traitement de la DMD. L'efficacité thérapeutique passe par le transfert dans les muscles (squelettiques et cardiaque), à l'aide d'un vecteur viral recombinant dérivé du virus adéno-associé (AAVr), d'un gène thérapeutique. La très grande taille du gène de la dystrophine empêche son insertion complète dans un vecteur AAVr (capacité maximale d'encapsidation = 4,7kb). Il est cependant possible d'utiliser comme gène thérapeutique une copie miniaturisée du gène de la dystrophine humaine, capable de remplacer le gène déficient et de produire une protéine « microDystrophine » fonctionnelle. Un grand nombre de microDystrophines différentes peuvent être générées, selon les domaines de la protéine Dystrophine qu'elles contiennent. Selon leur structure, les microDystrophines vont être plus ou

moins stables dans les tissus et surtout vont plus ou moins interagir avec des partenaires essentiels à sa fonction dans les cellules musculaires, et donc être plus ou moins thérapeutiques.

Début 2021, une étude pilote nous a permis d'évaluer la tolérabilité et l'efficacité d'expression de produits de thérapie génique codant pour 5 types différents de transgènes microDystrophines, après injection intraveineuse chez la souris mdx, modèle murin de la DMD. Les résultats obtenus nous ont permis de sélectionner 2 constructions qui se sont révélés efficaces en termes de tolérabilité, expression, stabilité de cette expression et restauration du complexe protéique associé à la Dystrophine. Le modèle de la souris mdx ne présentant pas d'atteinte cardiaque marquée, nous souhaitons désormais tester l'efficacité thérapeutique de ces 2 constructions dans le modèle du rat DMDmdx, autre modèle animal de la DMD, présentant un phénotype DMD marqué, et cela avec un nombre d'animaux plus important par groupe expérimental afin d'assurer la robustesse de ces évaluations phénotypiques.

Un maximum de 80 rats DMDmdx (64 rats + 16 animaux de remplacement) et de 20 rats témoins sains (WT, 16 rats + 4 animaux de remplacement) sera utilisé dans cette étude.

Les animaux seront injectés par voie systémique (intrapéritonéale) au stade néonatal (2 à 6 jours d'âge), qui permet d'observer un transfert de gène efficace dans le cœur. Les animaux seront ensuite suivis soit 3 mois, soit 6 mois post-injection. La DMD étant une maladie évolutive et dégénérative, il est en effet important de savoir si notre traitement de thérapie génique peut être efficace à plus ou moins long terme. Des analyses exhaustives seront réalisées chez les animaux injectés pour évaluer l'efficacité du traitement au niveau histologique mais aussi phénotypique (suivi hebdomadaire du poids à minima et évaluation de la fonction cardiaque). Des prélèvements sanguins seront également réalisés afin d'évaluer les paramètres sanguins des animaux (biochimie et numération formule sanguine, marqueurs cardiaques) 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 8 rats + 2 animaux de remplacement par groupe si nécessaire, soit un maximum de 100 animaux inclus.

Le nombre de 8 animaux par groupe expérimental est basé sur notre expérience précédente de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats cohérents et reproductibles dans des groupes de cette taille. Cela semble être un nombre minimal qui permette d'assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en terme d'animaux à inclure. Une analyse statistique sera réalisée, 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 de la mortalité, de la morbidité, de l'activité globale et des éventuelles présences de douleurs + pesées hebdomadaires)
- 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.

**20263** La fibrose pulmonaire est observée chez les patients atteints d'un certain nombre de pathologies pulmonaires inflammatoires (pneumopathies) ou suite à une exposition à un agent fibrosant (silice, fibre d'amiante, radiations ionisantes, bléomycine utilisée dans les protocoles de chimiothérapie).

La fibrose pulmonaire correspond à la transformation du tissu pulmonaire sain et distensible en tissu fibreux cicatriciel. Cette transformation provoque la diminution irréversible de la capacité de diffusion de l'oxygène au sein du tissu pulmonaire.

Les principaux symptômes sont une dyspnée (essoufflement) progressive à l'effort puis au repos, une toux sèche chronique, une fatigue et une faiblesse, une gêne dans la poitrine.

Etant donné que la fibrose pulmonaire une fois développée est définitive, les traitements mis en place visent à ralentir la progression de la fibrose voir à prévenir son apparition.

Après avoir constaté chez l'homme l'apparition d'une fibrose pulmonaire suite à l'administration de la bléomycine, un modèle animal est développé pour étudier le processus de développement de fibrose pulmonaire. En effet une administration unique de bléomycine chez l'animal permet d'obtenir le développement d'une fibrose dans les poumons après environ 2 semaines.

Ce projet consiste à évaluer les effets de candidats médicaments sur l'établissement de la fibrose pulmonaire suite à l'administration de bléomycine.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 720 cobayes 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 cobaye car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur le développement de la fibrose pulmonaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. De plus, pour certains anticorps thérapeutiques, le cobaye s'est avéré être la seule espèce parmi les rongeurs pour laquelle les anticorps humains sont actifs. Le cobaye va également être le seul animal à présenter une toux lors de l'établissement de la fibrose pulmonaire comme chez l'homme (le mécanisme de la toux est également identique à celui de l'homme) permettant ainsi de développer des candidats médicaments pouvant bloquer la toux.

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par (indiquer dans ce paragraphe au moins un aspect de raffinement qui concerne une procédure du projet):

- . le recours à des procédures les moins invasives possibles
- . le suivi d'éventuel signes cliniques
- . la détermination des points limites
- . le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- . la familiarisation des animaux aux procédures expérimentales
- . les soins et un suivi adaptés aux effets liées à l'administration de bléomycine afin de permettre une meilleure récupération des animaux

**20264** La candidose vulvovaginale (CVV) ou mycose vaginale, est une infection fongique de l'appareil génital féminin qui touche près de 75% des femmes dans le monde. Parmi ces femmes, on estime que 8% d'entre elles seront atteintes par une forme récidivante de la pathologie (CVVR) qui se définit par l'apparition de 4 épisodes ou plus par an. La CVVR touche ainsi près de 138 millions de femmes dans le monde, ce qui représente une souffrance pour ces femmes et un coût économique important. Les CVV sont des infections opportunistes causées par des levures appartenant au genre *Candida*. Parmi les différentes espèces, *Candida albicans* y est majoritairement mis en cause (près de 90% des cas). Les principaux symptômes associés aux épisodes de CVV comprennent

des démangeaisons, une irritation des zones vaginales et/ou vulvaires ainsi que des leucorrhées blanchâtres qui peuvent être très inconfortables chez les patientes qui en souffrent.

Les médicaments prescrits en première intention dans le traitement des épisodes aigus de CVV à *C. albicans* sont des molécules antifongiques de type azolées administrées par voie orale ou intravaginale. Utilisées depuis les années

1960, ces traitements sont efficaces mais leur utilisation est limitée dans la prise en charge d'épisodes récidivants puisque leur utilisation répétée favoriserait la sélection de mutants et/ou d'espèces fongiques résistantes à ces antifongiques.

Des études récentes suggèrent que la CVV résulte d'un dysfonctionnement du système immunitaire local incapable d'éliminer l'agent pathogène mis en cause et provoquant ainsi une réponse inflammatoire disproportionnée de la muqueuse vaginale responsable des symptômes associés à la CVV.

Dans ce contexte immunopathologique, ce projet vise à développer une nouvelle alternative thérapeutique aux molécules azolées dans le traitement de la CVVR. Nous proposons une approche innovante de vaccination, par l'administration de biomolécules au niveau de la muqueuse vaginale. Deux biomolécules, dont les fonctions attendues sont respectivement de moduler la réaction inflammatoire locale et d'améliorer la phagocytose de *C. albicans* par les cellules immunitaires, ont été développées. Ces biomolécules sont non toxiques pour les cellules animales. Remplacement : Les résultats obtenus à la suite d'expériences menées sur des cultures cellulaires *in vitro* afin d'évaluer l'efficacité thérapeutique de ce traitement sont très encourageants. Il nous est cependant essentiel de pouvoir confirmer son application thérapeutique dans un environnement vaginal et d'étudier son effet prophylactique dans le traitement d'épisodes de CVV. C'est pourquoi nous avons recours à l'expérimentation animale. Nous demandons l'utilisation de 285 souris.

Réduction : Dans ce projet, nous avons choisi de suivre l'évolution de l'infection chez l'animal par imagerie en utilisant une souche de *Candida* bioluminescente. Cette approche nous permettra de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés puisque aucune mise à mort des animaux ne sera requise pendant les expérimentations. De même nous ferons une étude pilote afin de déterminer les conditions d'expérimentation les plus optimales afin de limiter le nombre de souris à utiliser pour nos différentes procédures expérimentales.

Raffinement : Le bien-être des animaux sera pris en compte de leur naissance jusqu'à leur mort. Un suivi quotidien des animaux par un personnel qualifié sera mis en place ainsi qu'un enrichissement dans les cages d'hébergement. Bien que les désagréments pour les animaux soient limités, une grille de points limites est établie afin de mettre fin aux souffrances de l'animal si nécessaire. Les CVV entraînant surtout des désagréments locaux mais n'ayant pas d'impact sur l'état général, ces points limites ne seront probablement jamais atteints si les procédures expérimentales sont réalisées conformément à cette demande.

**20265** Pour produire l'énergie nécessaire à son fonctionnement, le cerveau utilise comme substrats du glucose et du lactate. Ces substrats sont amenés au cerveau par la circulation sanguine et transportés dans les cellules via des transporteurs spécifiques.

Le glucose est considéré comme la source d'énergie principale du cerveau. Pour une production d'énergie optimale, il est attendu que le flux de glucose (CMR<sub>glc</sub>) et le flux d'oxygène (CMRO<sub>2</sub>) soient dans un rapport de 6 (CMR<sub>glc</sub>/ CMRO<sub>2</sub>=6). Ce rapport s'appelle aussi l'index oxygène-glucose (OGI). Il a été montré que dans certaines situations, ce rapport varie.

Dans le cerveau sain au repos, l'OGI est en effet inférieur à 6. Le glucose pourrait donc être utilisé pour autre chose que la production d'énergie, comme pour produire d'autres métabolites tels que le lactate. Le lactate pourrait être à son tour utilisé comme source d'énergie et jouerait un rôle crucial dans le développement cérébral, la mémoire, et les maladies neurodégénératives.

Dans le cerveau sain en activité, des études ont également montré des variations de l'OGI, laissant ouverte la question de l'utilisation du glucose et/ou du lactate cérébral et de l'origine de l'énergie produite.

Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (AD), des études ont montré une forte correspondance entre les zones du cerveau préférentiellement atteintes par la maladie, et les zones du cerveau avec un OGI bas. Cependant, le lien entre cette modification et la maladie d'Alzheimer ne peut pas être directement étudié chez l'humain, par manque de données précoces et longitudinales.

Pour aborder ces différentes questions biologiques (rôle du couplage oxygène-glucose dans la réponse à une activité cérébrale chez le sujet sain, et dans le développement de la maladie d'Alzheimer), il est indispensable de recourir à des modèles animaux dans lesquels des manipulations biologiques contrôlées permettent de mieux caractériser ces mécanismes. Des techniques de neuro-imagerie quantitative et non-invasive sont nécessaires pour mesurer OGI dans les différentes conditions d'intérêt.

Ce projet vise à développer des méthodes d'imagerie par résonance magnétique (IRM) et émission de positons (TEP) pour étudier le métabolisme du cerveau en fonctionnement chez le rat sain (au repos et en réponse à des activations) et dans des modèles de la maladie d'Alzheimer. Ces développements rendront possible la mesure d'OGI non-invasive chez le rat, ce qui représente un enjeu majeur pour la recherche médicale, mais aussi un défi technologique. Pour cela nous adopterons une approche multimodale non invasive combinant 1H-IRM fonctionnelle (pour mesurer la réponse vasculaire), 17O-IRM (pour mesurer le flux d'oxygène) et 18FDG-TEP (pour mesurer le flux de glucose).

Après une phase de développement et de validation des méthodes d'imagerie, nous les utiliserons pour étudier plus précisément le rôle des transporteurs des deux principales sources d'énergies pour le cerveau (lactate et glucose) dans la réponse fonctionnelle. Nous utiliserons des modèles viraux locaux pour moduler le niveau d'expression de ces différents transporteurs chez le rat sain. Nous réaliserons ensuite des images des animaux sous anesthésie par IRM et TEP pendant une activation par des stimulations sensorielles, ou par un médicament.

Pour étudier le rôle du métabolisme dans la progression de la maladie d'Alzheimer, nous utiliserons des modèles dans lesquels la pathologie est induite par l'injection de virus, et nous utiliserons nos méthodes d'imagerie pour évaluer OGI de manière longitudinale au cours du développement des symptômes.

Les méthodes développées et les réponses apportées aux questions biologiques du projet ont un fort potentiel translationnel, et pourront ouvrir des pistes thérapeutiques visant la composante métabolique de la maladie d'Alzheimer.

Le projet prévoit au maximum 444 rats nés en élevage sur 5 ans. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Les animaux seront étudiés sous anesthésie avec des tests indolores et minimalement invasifs. Le suivi quotidien des rongeurs hébergés en groupe dans un milieu enrichi et l'application de critères d'arrêts en élevage et en expérimentation, permettra de garantir leur bien-être. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. La gestion de la douleur et de l'inconfort liée aux procédures expérimentales mettra en œuvre des méthodes d'anesthésie et d'analgésie pré- et post-opératoire, un soutien nutritionnel et thermique, ainsi qu'un suivi clinique post-opératoire incluant la prolongation des traitements analgésiques si besoin.

**20266** Le cancer colorectal est le second cancer, en termes de fréquence, chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième chez l'homme (après le cancer du poumon et celui de la prostate). Les cancers coliques ont une fréquence élevée en France : chaque jour, 100 personnes apprennent qu'elles ont un cancer colorectal. Plus exactement, on découvre 33 000 nouveaux cas par an, et 16 000 personnes en meurent. Chez les non-fumeurs, il est la deuxième cause de mortalité par cancer. Les hommes sont un peu plus touchés que les femmes (taux d'incidence de 40 et 27 pour 100000, respectivement). Aux Etats-Unis, le cancer colorectal est la deuxième cause majeure de décès par cancer et le troisième par ordre de fréquence chez l'homme et chez la femme.

L'arrivée des thérapies ciblées représente une nouvelle avancée, avec notamment les anticorps comme le bevacizumab commercialisé sous le nom d'Avastin®. Ces médicaments permettent de bloquer la formation de néo-vaisseaux (petits vaisseaux sanguins) destinés à fournir à la tumeur l'énergie dont elle a besoin pour grossir. Celle-ci est alors privée des nutriments indispensables à sa croissance et régresse. Une autre approche ciblée concerne les tumeurs qui surexpriment un facteur de croissance cellulaire (EGF). Un anticorps, le Cetuximab commercialisé sous le nom Erbitux®, bloque ce mécanisme. Les premiers résultats montrent qu'associées à la chimiothérapie, ces molécules augmentent le taux de réponse des patients. Elles font actuellement l'objet de nombreuses études.

Mais ces études ciblent l'environnement de la tumeur afin de bloquer son développement mais pas la tumeur directement. Aujourd'hui, dans le cas du cancer colorectal, il n'y a pas de molécule thérapeutique ciblant directement un marqueur exprimé sur les cellules cancéreuses.

Nous avons mis au point un anticorps qui cible directement les cellules cancéreuses et dont l'efficacité a été prouvée *in-vitro*. Nous voulons amener la preuve qu'il est aussi efficace *in-vivo* dans une situation où la cellule cancéreuse a le même environnement que chez l'Homme.

De la chirurgie abdominale sera nécessaire afin d'implanter les cellules sur le site précis, c'est-à-dire mimer au maximum le développement de la tumeur cancéreuse chez l'Homme. Cette chirurgie sera faite sous anesthésie générale pendant laquelle les paramètres vitaux de l'animal seront surveillés. Des analgésiques seront administrés avant le réveil de l'animal et celui-ci sera étroitement surveillé durant les heures post-opératoires.

Une première procédure servira à mettre au point le temps de développement des tumeurs et à valider la grille de score nous permettant de définir les points limites d'expérimentation des animaux. Lorsque tous les paramètres (prise et croissance tumorale) seront mis au point, nous allons tester différentes conditions expérimentales de traitements afin de montrer que notre molécule est efficace mais surtout plus efficace que l'Erbitux qui est la molécule de référence actuellement.

Ces traitements seront administrés par voie veineuse, orale pour les anticorps car ce sont les voies d'administration classiques chez l'Homme, ou en intra-péritonéale pour la chimiothérapie.

Les animaux sont ensuite surveillés tous les jours par des personnes expérimentées afin de détecter tous les signes répertoriés dans la grille de score. A la fin de l'expérimentation, les souris seront sacrifiées afin de prélever et analyser les tumeurs.

Afin de tester ces différentes conditions de manière fiables, il nous faut un nombre d'animaux suffisant afin d'obtenir des résultats robustes nous permettant de passer à des études cliniques chez l'Homme. Pour cela, nous avons calculé un besoin de 18 souris pour l'élevage (2 cages d'accouplement avec 1male et 2 femelles par lignée) , 192 animaux pour la mise au point de la croissance tumorale et 208 animaux pour la procédure de traitements soit au total 418 souris.

**20267** La Sclérose Tubéreuse de Bourneville (STB) est une maladie génétique responsable de la formation de tumeurs bénignes dans de nombreux tissus. Environ 8000 personnes en sont atteintes en France. Les patients STB peuvent développer des lésions particulières, appelées polykystose rénale et se caractérisent par la formation de kystes dans le rein. Ce phénomène conduit à une augmentation du volume du rein avec altération de la fonction rénale et pouvant entraîner une insuffisance rénale représentant un facteur de morbidité et de mortalité important. Les médicaments actuels sont inefficaces chez 30% à 40 % des patients, c'est pourquoi il est important d'améliorer la prise en charge de cette pathologie. Les mécanismes responsables de la détérioration du rein dans la STB sont encore mal compris notamment en raison de l'implication de différents types cellulaires et d'altérations structurales qui ne sont pas modélisables *in vitro*.

Des données obtenues sans recours à l'expérimentation animal suggèrent des modifications de l'activité de la protéine X qui est impliquée dans l'adhérence cellulaire. La protéine X pourrait jouer un rôle important dans la formation des kystes.

A l'heure actuelle, aucun modèle cellulaire ne permet cependant de modéliser fidèlement la formation des kystes dans le rein qui implique à la fois des modifications architecturales complexes

et des interactions entre différents types cellulaires. Afin d'évaluer si l'activité de la protéine X module la formation de kystes *in vivo*, il est nécessaire de recourir à des modèles animaux.

Le but de la recherche proposée ici est d'utiliser un modèle murin bien caractérisé de polykystose rénale associée à la STB et de le combiner à une modification du code génétique empêchant les modifications d'activité de la protéine X afin de déterminer si cette activation empêche ou réduit la formation des kystes. La bonne connaissance acquise sur le modèle de polykystose STB permettra de mener une étude sur des animaux présentant un phénotype dommageable modéré (avant l'âge de 110 jours).

Au total ce protocole de recherche nécessitera un maximum de 320 souris sur une durée de 5 ans. Pour ce faire ce modèle de souris sera développé et nécessitera 3 procédures.

La première procédure consiste à maintenir la lignée et générer les animaux des procédures 2 et 3.

La seconde consiste à effectuer un prélèvement de sang sous anesthésie profonde suivi d'une mise à mort de l'animal.

La troisième procédure consiste à réaliser une perfusion d'une solution permettant de préserver les tissus de façon optimale pour analyse microscopique.

La règle des « 3R » sera appliquée au cours de cette étude.

Réduire : 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. L'estimation de la taille des échantillons permettra une utilisation de tests statistiques efficaces.

Raffinement : Les conditions d'hébergement, d'élevage et de soin seront respectées par l'emploi de points limites précoces entraînant l'interruption de la procédure en cours et la mise à mort des animaux si nécessaire.

Toutes les procédures potentiellement douloureuses seront effectuées sous anesthésie profonde avec un effet analgésique pour prévenir les effets pré et per-opératoire et immédiatement suivi de la mise à mort de l'animal. Pour assurer le bien-être des animaux, les souris seront sous surveillance journalière et hébergées en cage ventilée à 5 souris par cage. Elles bénéficieront d'un environnement enrichi constitué de coton, de tunnels, de « maisons » en carton ainsi que des bâtonnets de bois à ronger.

Remplacer : Enfin l'analyse des mécanismes de régulation impliqués dans la kystogenèse se fera à l'aide de modèles *in vitro* remplaçant le recours à l'expérimentation animale.

A terme ce projet permettra de mieux comprendre le rôle de la protéine X dans le développement de la polykystose rénale dans un contexte de STB et d'identifier des cibles responsables de la pathologie. Enfin ce projet est susceptible de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces patients réfractaires aux traitements actuels.

**20268** Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont responsables de 17,7 millions de morts dans le monde chaque année, soit 31% des décès. Les traitements médicamenteux usuels sont pour la plupart palliatifs. Le seul traitement radical est chirurgical, par transplantation cardiaque, et est lui-même limité par le nombre de greffons. Pour traiter l'insuffisance cardiaque, le traitement par transplantation de cellules, appelé thérapie cellulaire, est de plus en plus envisagé. En effet, les premiers essais cliniques de transplantation de cellules précurseurs cardiaques chez des patients ayant subi un infarctus du myocarde ont été encourageants. Cependant, la cardio-protection, apportée par ces cellules, n'est pas dépendante de leur implantation à long terme mais elle est attribuable aux Vésicules Extracellulaires (VEs) qu'elles secrètent. Les VEs sont des nanoparticules sécrétées par toutes les cellules de l'organisme assurant le transfert de leur contenu biologiquement actif dans les cellules cibles dont elles modifient ainsi le comportement. Les VEs assurent donc un rôle clé dans la communication entre les cellules. Ces VEs augmentent la survie des cellules cibles, leur capacité de migration et de prolifération. Elles sont également capables de diminuer



l'inflammation et d'augmenter leur capacité à produire de l'énergie. Afin d'évaluer le bénéfice fonctionnel apporté par ce traitement, il est nécessaire d'avoir recours à des tests précliniques chez le petit animal. Dans un modèle souris de cardiopathie ischémique (provoquée par un infarctus du myocarde), il a été montré que l'administration des VEs directement dans le muscle cardiaque était capable de reproduire l'effet cardio-protecteur des cellules dont elles sont issues. Internalisées par les cellules cibles du coeur, les VEs leur transmettent un signal de réparation afin de diminuer la fibrose. Ce projet cible donc une « thérapie cellulaire sans cellules » fondée sur la seule administration aux patients des VEs et exploitant uniquement les cellules comme sources pour leur production. Pour des raisons épidémiologiques, il est également important de savoir si ces VEs pourraient être efficaces dans le traitement de certaines cardiopathies non ischémiques. Leur incidence étant élevée et les médicaments classiques donnant des résultats inconstants, cela justifie d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques. Ainsi, au cours des dernières années, le pronostic de nombreux cancers s'est amélioré mais certains patients survivants et traités par chimiothérapie développent une cardiomyopathie dilatée (CMD). L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'action des VEs sur la baisse de la fonction cardiaque évaluée par la fraction d'éjection ventriculaire gauche (FEVG - le critère principal observé chez l'Homme), dans un modèle aigu d'expositions répétées à la doxorubicine (DOX) chez le rat. Les rongeurs étant des mammifères ayant un système cardiovasculaire proche de l'humain, la plupart des tests sont donc effectués sur le modèle murin. Pour que l'effet du traitement par les VEs s'exerce pleinement, des administrations répétées sont nécessaires. Nous avons donc choisi l'injection intraveineuse étant donné qu'elle est simple et non invasive. Les évaluations fonctionnelles se feront par échocardiographie et IRM avant et après la chimiothérapie ainsi qu'en fin d'étude. Afin de respecter la règle 1) Remplacement des "3R" nous avons mis en évidence sur des modèles cellulaires que les VEs étaient capables d'améliorer la viabilité des cellules contractiles cardiaques et leur capacité de production d'énergie. Conformément aux exigences du 2) Réduction des "3R", le nombre d'animaux sera réduit à son minimum, l'action des VEs sur les paramètres cliniques (poids, biomarqueurs plasmatiques) sera aussi étudiée ainsi qu'à la suite de la mise à mort des animaux sur le remodelage cellulaire connu pour conduire à l'insuffisance cardiaque par des techniques d'histologie et de transcriptomique. Une étude statistique a aussi été réalisée afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés dans le projet sans compromettre l'analyse statistique des résultats : au total 240 animaux seront utilisés pour ce projet qui durera 5 ans. Pour ce qui est du 3) Raffinement des "3R", le nombre d'imageries a été réduit à son minimum et elles seront réalisées, ainsi que les injections des traitements, sous anesthésie générale gazeuse. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Des points limites sont établis et tous les animaux qui ont atteint ces points limites seront mis à mort précocement. Dans une perspective clinique, l'utilisation des VEs simplifierait la production, la reproductibilité et les contrôles-qualité par rapport à la greffe de leurs cellules-mères. L'objectif à long terme est de mettre à disposition des cliniciens un médicament biologique dérivé de cellules et susceptible d'améliorer le pronostic des cardiopathies à la chimiothérapie dont la gravité peut compromettre le bénéfice d'un traitement anticancéreux qui a été efficace sur la maladie causale.

**20269** Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. En particulier, l'athérosclérose est connue pour ses conséquences : principalement l'infarctus du myocarde et l'angine de poitrine, mais aussi les accidents vasculaires cérébraux et l'anévrisme aortique. Il s'agit de la formation, dans la paroi des artères, de plaques d'athérome : un dépôt de cholestérol, puis de calcaire et de cellules, qui s'entoure d'une chape fibreuse. Ces plaques grossissent dans la paroi, rétrécissant la lumière de l'artère. Dans la plupart des cas elles restent stables, non symptomatiques. Mais il arrive que la chape fibreuse devienne fragile. Le risque alors est la rupture de plaque, qui, en libérant son contenu dans la circulation, provoque la formation d'un caillot et l'obstruction de l'artère (la thrombose).

Les données de littérature montrent que la réponse immuno-inflammatoire joue un rôle déterminant dans le développement de l'athérosclérose. La compréhension des mécanismes impliqués dans la régulation de l'inflammation est donc un enjeu majeur de santé publique. En particulier, le développement de nouvelles approches basées sur la modulation spécifique de la réponse immuno-

inflammatoire représente une alternative d'intérêt dans le traitement des maladies cardiovasculaires. Pour cela on s'intéresse à des enzymes impliquées dans la modulation de la réponse immuno-inflammatoire dans le contexte de l'athérosclérose. Pour induire l'athérosclérose, nous allons utiliser un modèle d'athérosclérose chez la souris (males et femelles, nombre total estimé de souris : 480 sur une durée de 5 ans). Ce modèle murin est une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes survenant au cours de cette maladie. En effet, actuellement il n'y a pas de systèmes *in vitro* qui reproduisent, imitent ou permettent la modélisation des interactions cellulaires et moléculaires qui conduisent au développement de l'athérosclérose chronique. Il est devenu évident que les données obtenues en utilisant des lignées cellulaires doivent être confirmées dans un système plus évolué. Pour valider les candidats potentiellement impliqués dans le processus athéromateux, il est essentiel d'analyser leur rôle dans le développement de la maladie *in vivo*. Des souris génétiquement modifiées nous permettront d'analyser spécifiquement le rôle de ces enzymes dans un contexte de développement de l'athérosclérose. Nous avons déjà obtenu les différentes lignées de souris qui seront utilisées dans ce projet et qui n'ont pas de phénotype dommageable. Ce projet comporte 1 procédure qui consiste en la mise sous régime riche en matières grasses pendant une durée de régime courte (8 semaine) ou longue (12 semaines) afin de favoriser le développement des plaques d'athérosclérose et un prélèvement sanguin avant la mise à mort des animaux. Pour respecter le principe des 3R, 1/ Remplacer : il n'est pas possible d'utiliser des expériences *in vitro* pour mimer l'athérosclérose. 2/ Réduire : le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux. 3/ Raffiner : la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie adaptée durant la procédure, et l'établissement de points limites adéquats. L'objectif est de définir de nouvelles approches thérapeutiques ciblant la réponse immuno-inflammatoire pour le traitement des patients présentant des maladies cardiovasculaires.

**20270** Les maladies cardiovasculaires sont aujourd'hui la première cause de mortalité dans les pays développés. En particulier, l'athérosclérose est connue pour ses conséquences : principalement l'infarctus du myocarde et l'angine de poitrine, mais aussi les accidents vasculaires cérébraux et l'anévrisme aortique. Il s'agit de la formation, dans la paroi des artères, de plaques d'athérome : un dépôt de cholestérol, puis de calcaire et de cellules, qui s'entoure d'une chape fibreuse. Ces plaques grossissent dans la paroi, rétrécissant la lumière de l'artère. Dans la plupart des cas elles restent stables, non symptomatiques. Mais il arrive que la chape fibreuse devienne fragile. Le risque alors est la rupture de plaque, qui, en libérant son contenu dans la circulation, provoque la formation d'un caillot et l'obstruction de l'artère (la thrombose). Les données de littérature montrent que la réponse immuno-inflammatoire joue un rôle déterminant dans le développement de l'athérosclérose.

Notre projet a pour but d'étudier l'implication des cellules immunitaires associées aux muqueuses dans l'athérosclérose.

Pour ce faire, nous allons utiliser un modèle d'athérosclérose chez la souris (nombre total estimé de souris : 480 sur une durée de 5 ans, utilisation à la fois des males et des femelles à l'âge adulte). Ce modèle murin est une étape indispensable dans la compréhension des mécanismes survenant au cours de cette maladie. En effet, actuellement il n'y a pas de systèmes *in vitro* qui reproduisent, imitent ou permettent la modélisation des interactions cellulaires et moléculaires qui conduisent au développement de l'athérosclérose chronique. Il est devenu évident que les données obtenues en utilisant des lignées cellulaires doivent être confirmées dans un système plus évolué. Pour valider ces cellules à potentiel anti-athéromateux, il est essentiel d'analyser leur rôle dans le développement de la maladie *in vivo*. Des souris génétiquement modifiées nous permettront d'analyser spécifiquement le rôle de ces cellules dans un contexte de développement de l'athérosclérose. Ce projet comporte 1 procédure qui consiste en la mise sous régime riche en matières grasses (2 durées de régime : 8 et 12 semaines) afin de favoriser le développement des plaques d'athérosclérose et un prélèvement sanguin avant une mise à mort des animaux. Pour respecter le principe des 3R, 1/ Remplacer : il n'est pas possible d'utiliser des expériences *in vitro*

pour mimer l'athérosclérose. 2/ Réduire : le nombre d'animaux utilisé sera réduit par l'utilisation de tests statistiques déterminant la taille minimale des groupes expérimentaux. 3/Raffiner : la souffrance animale sera réduite au maximum par le raffinement des méthodes expérimentales notamment l'utilisation d'anesthésie adaptée durant la procédure, et l'établissement de points limites adéquats. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant ces cellules chez les patients présentant des pathologies associées aux maladies athéromateuses.

**20271** Dans l'industrie électro-nucléaire, la manipulation de métaux radioactifs (plutonium, américium, uranium, cobalt...) ou stables (cadmium) constitue un risque de contamination interne (=pénétration dans le corps, incorporation) pour les travailleurs. Une fois entrés dans le corps suite à leur inhalation accidentelle ou une blessure, ces métaux peuvent se fixer durablement à certains organes cibles. A cause de leur toxicité chimique et/ou radiologique, un risque sanitaire à moyen ou long-terme peut alors y être associé. Afin de limiter ce risque, la seule stratégie thérapeutique est de stimuler leur décorporation (élimination corporelle) et donc de limiter leurs dépôts tissulaires. Pour cela, une personne contaminée par un métal donné est traitée avec une molécule capable de lier le métal concerné pour en faciliter son excrétion par les voies naturelles. On appelle ce type de molécule « agent complexant » (spécifique du métal à décorporer). Selon le métal, le complexant et la thérapeutique associée sont de très peu à moyennement efficaces. Le but de notre laboratoire est de trouver, d'améliorer, d'adapter ou d'optimiser des solutions thérapeutiques pour aboutir à une décorporation satisfaisante des métaux d'intérêt. Il est important pour cela de considérer les différents scénarios possibles de contamination dans l'industrie nucléaire (type de métal, forme physico-chimique du métal, voie de contamination...) et le contexte de mise en évidence de la contamination (c'est-à-dire précocement ou tardivement).

La mise en place au laboratoire de modèles *in vitro* (et cellulaires) nous permet d'évaluer en amont le potentiel complexant de molécules candidates (ex : 3,4,3-LiHOPO, 4,4,4-LiHOPO, 5-LiO(Me-3,2-HOPO), EHBP, DTPA, EDTA, penicillamine, CDTP, acide ascorbique, bicarbonate de sodium, différents dipodes et tripodes de biphosphonates...), voire de tester des capacités d'intérêt de certaines formes galéniques des complexants comme leur pénétration cellulaire (forme liposomale du DTPA et 3,4,3-LiHOPO). Toutefois, une fois ces complexants retenus ou ces formes galéniques approuvées (ceux et celles testés dans le présent projet), l'évaluation de leur efficacité thérapeutique nécessite des études à l'échelle de l'organisme entier et donc d'animaux. En effet, les tests des différents protocoles thérapeutiques requièrent la considération simultanée des différents organes impliqués dans la rétention ou l'élimination des métaux d'intérêt (poumons, site de blessure, foie, reins, squelette), et celle des excréta (urine et fèces).

Par ailleurs, l'influence de la voie d'administration des agents complexants (pulmonaire, locale sur le site de blessure, orale, systémique) sur leur action locale ou systémique ne peut pas être évaluée sur des modèles *in vitro* qui ne considèrent au mieux que quelques types cellulaires d'un seul organe, sans intégrer non plus les différentes barrières biologiques rencontrés par les agents complexants (barrière pulmonaire, barrière intestinale...) ou les compartiments de transfert tels que le sang et les liquides interstitiels.

Le présent projet s'étale sur 5 années et utilisera 762 rats provenant d'un élevage agréé. Le modèle rat a été choisi en raison des nombreuses données expérimentales sur sa contamination par des métaux, acquises par notre laboratoire ou disponibles dans la littérature scientifique. Cela permet de s'inspirer des précédents résultats pour ne pas refaire les mêmes expérimentations et pour mieux cibler nos recherches, ce qui limite au maximum le nombre d'animaux nécessaires à notre projet.

Les études nécessiteront 5 procédures expérimentales, basées essentiellement sur les différentes voies d'administration des métaux. Ces procédures ont été réfléchies de manière à engendrer le moins de souffrance possible aux rats tout en obtenant le maximum d'informations pertinentes. Toutes les pratiques invasives d'administration des métaux ou des agents complexants seront réalisées sous anesthésie. La durée des expérimentations et la quantité de métal radioactif ou non

seront largement inférieures à celles induisant le développement de pathologies associées aux contaminations, d'après la littérature et l'expérience acquise dans notre laboratoire, qui a longuement étudié la toxicité des actinides émetteurs de particules alpha. Dès que possible, des enrichissements nutritionnels et matériels seront mis en place au sein des cages d'hébergement des rats de façon à assurer au mieux leur bien-être. Une observation de l'état général et du comportement des rats sera effectuée quotidiennement afin d'agir au plus vite pour soulager une éventuelle souffrance non prévisible, par des traitements antalgiques ou par l'arrêt de l'expérimentation. Afin d'estimer le plus objectivement possible s'il y a souffrance et le niveau de souffrance, de multiples critères seront considérés et évalués selon des points limites.

**20272** La thématique de recherche vise à étudier les mécanismes physiopathologiques et à développer des approches thérapeutiques pour l'ataxie de Friedreich. L'ataxie de Friedreich est une maladie génétique rare, caractérisée par des atteintes neurologiques et cardiaques. Les atteintes neurologiques se manifestent par une diminution progressive de la coordination des mouvements volontaires dans le temps et l'espace. La cardiomyopathie est responsable de la mort précoce de 60% des patients avant l'âge de 40 ans. C'est une maladie gravement invalidante et à ce jour incurable.

L'ataxie de Friedreich est causée par un déficit cellulaire sévère en protéine frataxine. Ce déficit induit la dysfonction des mitochondries qui produisent plus de 80% de l'énergie cellulaire, une dérégulation du métabolisme du fer et la production de radicaux libres (stress oxydant). Différentes molécules pharmacologiques, telles que des antioxydants ou des chélateurs de fer, ciblant les conséquences secondaires du déficit en frataxine ont été évaluées sans succès chez les patients. Pour traiter la cause primaire, nous avons développé une approche de thérapie génique, permettant la production de la protéine frataxine dans les cellules déficientes et y corriger les conséquences pathologiques. Des travaux prometteurs montrent que cette approche est efficace mais des optimisations doivent encore être mis au point pour le développement préclinique de cette approche.

La thématique de recherche vise à étudier les mécanismes physiopathologiques et à développer des approches thérapeutiques pour l'ataxie de Friedreich. L'ataxie de Friedreich est une maladie génétique rare, caractérisée par des atteintes neurologiques et cardiaques. Les atteintes neurologiques se manifestent par une diminution progressive de la coordination des mouvements volontaires dans le temps et l'espace. La cardiomyopathie est responsable de la mort précoce de 60% des patients avant l'âge de 40 ans. C'est une maladie gravement invalidante et à ce jour incurable.

L'ataxie de Friedreich est causée par un déficit cellulaire sévère en protéine frataxine. Ce déficit induit la dysfonction des mitochondries qui produisent plus de 80% de l'énergie cellulaire, une dérégulation du métabolisme du fer et la production de radicaux libres (stress oxydant). Différentes molécules pharmacologiques, telles que des antioxydants ou des chélateurs de fer, ciblant les conséquences secondaires du déficit en frataxine ont été évaluées sans succès chez les patients. Pour traiter la cause primaire, nous avons développé une approche de thérapie génique, permettant la production de la protéine frataxine dans les cellules déficientes et y corriger les conséquences pathologiques. Des travaux prometteurs montrent que cette approche est efficace mais des optimisations doivent encore être mis au point pour le développement préclinique de cette approche.

Le projet proposé a pour objectif de finaliser le développement préclinique. Dans un premier temps, nous testerons des nouveaux vecteurs pour leur efficacité thérapeutique. Dans un deuxième temps, nous testerons des doses décroissantes afin d'identifier la dose minimale thérapeutique nécessaire pour restaurer les fonctions neurologiques chez l'animal.

Ce projet de recherche fondamentale et translationnelle sera conduit chez la souris en 5 procédures. Une étude pilote sera faite chez l'animal sain afin de déterminer quel vecteur exprime le niveau de frataxine le plus proche du niveau normal après injection intraveineuse. En parallèle, une deuxième procédure sera conduite afin de valider le modèle qui reproduit les symptômes neurologiques de la

maladie par différents tests comportementaux standardisés et par des tests de conduction nerveuse. Dans les deux procédures suivantes, nous testerons l'efficacité thérapeutique du vecteur après injection intraveineuse chez ce modèle par un suivi au cours du temps des fonctions neurologiques. Une injection avant l'apparition des symptômes pour évaluer le potentiel préventif de notre approche. Une injection après l'apparition des symptômes pour évaluer le potentiel correctif de notre approche. Enfin, la dernière procédure avec des doses décroissantes du vecteur aura pour but d'identifier la dose minimale thérapeutique nécessaire pour restaurer les fonctions neurologiques chez l'animal. Afin de corrélérer l'effet thérapeutique au niveau d'expression de la frataxine ainsi que le pourcentage de cellules corrigées, tous les animaux seront mis à mort pour des prélèvements et des analyses histopathologiques et biochimiques du système nerveux.

CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction

Il est estimé que le projet mobilisera sur 5 ans 210 animaux au maximum avec enchaînement séquentiel et conditionnel des procédures. Cet effectif correspond au nombre d'animaux nécessaire afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. Afin de réduire au minimum le nombre d'animaux, les mêmes animaux seront utilisées pour réaliser les analyses fonctionnelles, histologiques, moléculaires et biochimiques.

Raffinement

Un soin particulier sera apporté aux animaux et dès les premiers signes d'ataxie de la nourriture gélifiée sera mise à disposition dans la cage. Nous avons établi des points limites suffisamment prédictifs avec un scoring adapté à notre modèle.

Remplacement

Le but ultime du projet est de trouver une thérapie efficace pour l'ataxie de Friedreich afin d'améliorer la vie des patients et si possible de stopper ou au moins ralentir la progression de la maladie. Les nouveaux vecteurs utilisés ont d'abord été testé dans des cellules en culture afin de remplacer l'animal, mais afin de déterminer leur efficacité *in vivo*, il est indispensable de réaliser notre approche sur un modèle murin de la maladie.

**20273** Nous avons tous utilisé un jour l'expression « C'est comme le vélo! » pour convaincre une personne de la facilité d'une tâche. De fait, une fois que nous sommes entraînés et que nous l'avons appris, nous faisons du vélo automatiquement, sans réfléchir, et ne l'oublions jamais. Cette forme de mémorisation de routines motrices, appelée mémoire procédurale, permet d'automatiser certains de nos comportements et libérer ainsi des ressources cognitives pour des tâches plus complexes. La capacité d'apprentissage et de mémorisation du cerveau est particulièrement impressionnante mais notre compréhension des mécanismes neuronaux qui les font exister restent encore très parcellaires.

Notre projet propose l'hypothèse que les ganglions de la base, un ensemble de structures sous-corticales dont les dysfonctionnements sont associés à des troubles comportementaux et moteurs importants (Parkinson, Huntington, obsessions, etc), jouent un rôle central dans la mise en place des routines motrices en sculptant l'activité des réseaux neuronaux de manière à optimiser le transfert d'information. Ce projet nécessite une approche expérimentale d'enregistrements et de perturbation de l'activité neuronale des ganglions de la base sur les animaux engagés dans un comportement. Le modèle souris (*Mus Musculus*) est parfaitement adapté compte-tenu de la similarité de l'organisation anatomo-fonctionnelle de son cerveau avec celle de l'homme et de l'utilisation d'outils de transgénése nécessaires pour disséquer la contribution de structures et neurones ciblés. Nous utiliserons une approche pluridisciplinaire incluant l'enregistrement de l'activité de centaines de neurones simultanément chez l'animal éveillé, l'analyse de la dynamique des réseaux et de leur connectivité et enfin, la perturbation de l'activité neuronal permettant d'établir une relation causale entre l'activité de neurones spécifiques et le comportement de l'animal. L'utilisation de vecteurs viraux permettant de cibler spécifiquement une structure d'intérêt et/ou des

populations neuronales constitue une approche unique pour disséquer la composition et la dynamique des réseaux neuronaux.

Une meilleure compréhension du fonctionnement des ganglions de la base est primordiale pour envisager et développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant les maladies qui les affectent (Parkinson, Huntington, obsessions, impulsivité, addiction). Le nombre total d'animaux prévu pour cette étude (3 procédures expérimentales) est de 832. Le projet vise à lier la dynamique des réseaux neuronaux à un comportement grâce à approches intégrées d'enregistrement et de perturbations de structures ciblées, il nous est donc impossible de remplacer le modèle animal vivant par des cultures cellulaires ou des simulations informatiques. De plus, la conception de ce projet a suivi les principes de réduction et raffinement sans compromettre la validité des résultats: (i) pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, si possible l'animal sera utilisé comme son propre contrôle, à la fois les mâles et les femelles seront utilisés, les techniques utilisées permettent d'enregistrer des centaines de neurones simultanément, tout ça permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. (ii) pour raffiner, tout est mis en œuvre pour limiter le stress. Les souris seront hébergées dans des cages avec milieux enrichis (bâtonnets de bois, tunnels en carton, papier). Les souris seront habituées progressivement aux protocoles comportementaux et aux expérimentateurs. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie profonde et les soins post-opératoires seront appliqués avec des anti-inflammatoires et des antalgiques. 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 permettra une intervention immédiate et appropriée si des signes de souffrance apparaissent et les points limites atteints.

**20274** Le microbiote intestinal joue un rôle clé dans le contrôle des infections respiratoires. Il arme à distance certaines cellules du système immunitaire au niveau pulmonaire et ainsi limite la réplication des agents pathogènes. Son rôle dans la production des interférons de type I et de type III, cytokines clés dans la défense contre les infections virales, est notable. De nombreux facteurs, notamment des métabolites comme les acides gras à chaînes courtes (AGCC), participent aux mécanismes de défense contre les infections respiratoires. L'objectif de notre projet est d'évaluer l'effet de certains probiotiques (microorganismes ayant des effets bénéfiques sur la santé) et/ou bactéries commensales (probiotiques de nouvelle génération ou Livebiotherapeutics) et de prébiotiques (fibres alimentaires favorisant la croissance des probiotiques au niveau intestinal) sur la pathologie associée aux infections par le SARS-CoV-2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) ou par le virus influenza, responsable de la grippe. Nos travaux récents ont mis en évidence l'impact de l'infection par ces deux virus sur la composition et l'activité métabolique du microbiote intestinal dans des modèles précliniques de Coronavirus disease 2019 (COVID-19) et de grippe. Notre hypothèse, partagée par d'autres équipes travaillant sur le sujet, est que cette dysbiose participe à l'évolution de la maladie. Renforcer la capacité naturelle du microbiote intestinal à optimiser les défenses contre les virus respiratoires et réduire l'altération fonctionnelle du microbiote intestinal imposée par l'infection pourrait donc avoir des conséquences bénéfiques sur la pathologie associée aux infections respiratoires virales.

Nous nous concentrerons sur l'utilisation de probiotiques et de prébiotiques sélectionnés ou connus pour favoriser la production des AGCC. Nous avons montré que ces métabolites jouent un rôle bénéfique au cours de l'infection par le virus grippal. Ils limitent également la susceptibilité aux surinfections bactériennes (Sencio, Cell report 2020 et Infection & Immunity 2021). Parmi les paramètres d'analyse, nous évaluerons l'effet des traitements sur la charge virale, la pathologie pulmonaire et intestinale, les marqueurs inflammatoires systémiques, la composition du microbiote intestinal et la surinfection bactérienne (dans le cas de la grippe).

A ce jour, aucun système *in vitro* ne permet de reproduire les interactions hôte-virus aboutissant au COVID-19 ou à la grippe. Il est admis que le modèle de la souris C57BL/6 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. Les modèles d'infection par le virus influenza sont optimisés chez la souris C57BL/6. L'évaluation de l'efficacité des composés

antiviraux ou d'immuno-modulateurs peut être réalisée dans ces modèles. Les études *in vivo* sont requises avant tout passage à l'homme. Il n'est pas possible à ce jour de remplacer les modèles *in vivo* pertinents par des tests *in vitro* ou *in silico*.

Deux procédures expérimentales sont décrites : 1) Impact des traitements probiotiques et prébiotiques sur la COVID-19 expérimentale (modèle murin). Des souris transgéniques exprimant le récepteur ACE2 humain seront utilisées. 2) Impact des traitements probiotiques et prébiotiques sur la grippe expérimentale et la surinfection par *Streptococcus pneumoniae* (modèle murin). Nous proposons des traitements avec des probiotiques et des prébiotiques dont certains sont déjà utilisés chez l'homme. Les critères expérimentaux sont les suivants : (1) charge virale (et bactérienne dans le cas de protocole de surinfection) dans les poumons, (2) inflammation pulmonaire, intestinale et systémique, (3) prise de poids corporel (relevé quotidien) (4) modulation de la composition et de la fonctionnalité du microbiote.

Ce projet expérimental répond aux exigences des 3R.

Remplacement : il n'existe pas de méthode de substitution pour étudier les effets physiopathologiques des infections respiratoires, notamment par SARS-CoV-2 et influenza 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 8 animaux par groupe expérimental. Au total, 408 souris seront nécessaires pour la procédure 1 et 408 seront nécessaires pour la procédure 2, soit un total de 816 souris. 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.

**20275** Notre laboratoire s'intéresse à développer de nouvelles approches de thérapie génique via les cellules souches sanguines pour traiter des maladies génétiques rares. L'approche repose sur une première étape consistant à collecter les cellules souches sanguines du patient puis de réaliser un transfert d'un gène thérapeutique dans ces cellules souches à l'aide d'un vecteur lentiviral. Le patient est ensuite préparé à la transplantation par un traitement dit « myelo-ablatif » qui consiste à éliminer toutes ses cellules souches sanguines. Ensuite, les cellules génétiquement modifiées sont réinfusées au patient afin de reconstituer de façon permanente son système sanguin avec ses cellules sanguines génétiquement modifiées. Cette approche peut servir à traiter de nombreuses maladies sanguines ou immunitaires mais aussi de traiter d'autres maladies car il a été montré que les cellules sanguines peuvent échanger certains composés cellulaires avec les tissus à travers la formation de nanotubes (protubérances membranaires connectant deux cellules).

La dysferlinopathie est une maladie génétique causée par un déficit de la protéine dysferline impliquée dans le bon fonctionnement des cellules musculaires. La maladie se manifeste par une diminution progressive de la force des muscles du bassin, des cuisses et des épaules. Si la transplantation de cellules souches hématopoïétiques (CSH) génétiquement corrigées permet de restaurer le bon fonctionnement musculaire, cela consisterait en un traitement permanent de la maladie après une seule transplantation.

Malheureusement la question ne peut pas se traiter *in vitro*. En effet de nombreux paramètres *in vivo* contrôlent d'une part, la capacité d'adressage et de greffe des CSH dans leur niche osseuse et d'autre part la capacité des CSH corrigées à connecter avec les tissus pathologiques et à réaliser les échanges cellulaires. Notre projet consiste donc à tester cette approche de transplantation de CSH dans le modèle murin de la dysferlinopathie qui récapitule la progression de la maladie. Les souris seront donc dans un premier temps irradiées (myélo-ablation) puis transplantées avec des CSH provenant de souris déficientes pour la dysferline mais corrigées par un lentivirus codant pour

la protéine fonctionnelle. Elles seront ensuite suivies pour étudier la prévention du déficit musculaire au cours du temps.

Raffinement : le modèle murin choisi qui est un modèle de la dysferlinopathie, est le plus pertinent en l'état des connaissances. Les prélèvements sanguins se feront dans la veine faciale sans anesthésie et les souris seront placées dans les cages stérilisées à ventilation individuelle par groupe de 6 de façon randomisée.

Réduction : l'effet des greffes de CSH sur les souris sera suivi de manière longitudinale (une même souris sera analysée à plusieurs points de temps). Le nombre nécessaire de souris aura été calculé de manière statistique dans le but d'obtenir des résultats robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

Remplacement : Des tests *in vitro* de co-culture entre des cellules déficientes pour la dysferline et les CSH génétiquement modifiées nous donnerons des informations sur le mode de communication entre ces deux types cellulaires.

Pour l'ensemble de notre projet, qui durera 5 ans, nous estimons à 180 le nombre de souris nécessaires à notre étude.

**20276** On appelle microbiote l'ensemble des micro-organismes (bactéries, virus, champignons) qui peuple un organisme. La compréhension des interactions entre le microbiote et le système immunitaire apporte des éléments indispensables pour comprendre le rôle du microbiote dans le développement ou la protection de maladies impliquant l'immunité. C'est le cas notamment des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) pour lesquelles le microbiote est un facteur influençant ces maladies.

Les MICI telles que la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique se caractérisent par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif. Les symptômes des MICI comprennent des douleurs abdominales, de la diarrhée, la nausée et une perte de poids. Ces symptômes sont handicapants pour les personnes atteintes et des complications peuvent être observées chez une partie des personnes touchées.

Nous savons que le système immunitaire peut être directement modulé par le microbiote intestinal, notamment par des mécanismes impliquant la production de petits composés appelés métabolites. Les métabolites produits par le microbiote ont un impact direct sur l'activité du système immunitaire en induisant ou en régulant l'inflammation. Les probiotiques sont des microorganismes vivants (bactéries, levures) qui apportent un bénéfice au fonctionnement d'un organisme.

Nous souhaitons étudier l'impact d'une stratégie combinant l'utilisation d'un probiotique reconnu et de la surexpression d'une classe de métabolite aux propriétés anti-inflammatoires. Pour cela, nous avons mis au point un probiotique surproduisant un métabolite aux propriétés anti-inflammatoires. La validation de cette production a été confirmée lors de plusieurs études *in vitro*. L'étude de ce probiotique ingénieré permettra d'étudier l'utilité de cette stratégie pour la prise en charge des MICI et apportera des informations fondamentales sur la compréhension des interactions hôtes micro-organismes. Nous validerons la production de notre métabolite dans l'environnement intestinal de souris ainsi que son impact sur l'immunité intestinale. Nous étudierons ensuite l'impact de cette stratégie sur la gravité d'une colite induite chez la souris afin de comprendre le rôle de notre probiotique sur les signes cliniques de la colite, l'immunité intestinale et le microbiote intestinal. Pour cela, nous évaluerons notamment l'évolution des symptômes tels que la diarrhée, la perte de poids et la présence du sang dans les fèces. À la fin de cette expérience, une étude des tissus intestinaux sera réalisée.

Au total, 254 souris seront nécessaires à la réalisation de ce projet dans le respect de la réglementation en vigueur et notamment de la règle des 3 R.

REMPACEMENT : la validation de notre probiotique ingénieré a été réalisée lors de plusieurs études *in vitro*. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle *in vitro* mimant la complexité des interactions au sein du microbiote, les interactions entre l'hôte et le microbiote et les mécanismes de régulation inflammatoires mis en place par l'immunité lors des maladies inflammatoires



chroniques de l'intestin. L'expérimentation animale est dans ce contexte un outil indispensable pour pouvoir évaluer de manière spatiale (en étudiant une portion de l'intestin) et temporelle (en évaluant l'évolution de paramètres sanguins ou fécaux) l'impact d'une stratégie probiotique dans un modèle physiologique ou pathologique choisi. La souris est l'espèce la plus susceptible de fournir des résultats satisfaisants et comparables aux études précédemment publiées dans cette thématique.

**REDUCTION** : chaque groupe sera constitué d'un nombre suffisant d'animaux en adéquation avec les protocoles standard utilisés dans la littérature.

**RAFFINEMENT** : les souris sont hébergées en groupe dans des cages enrichies et bénéficieront d'une semaine d'acclimatation avant le début des procédures expérimentales. Une attention journalière sera apportée aux animaux afin d'assurer leur bien-être. La fréquence et le volume des prélèvements sanguins sont réglementaires et réduits aux exigences scientifiques ; ils sont réalisés sous anesthésie générale et par un expérimentateur habilité et formé. Dans le cas où les points limites définis seraient atteints, l'animal sera mis à mort avant la fin de procédure pour arrêter toute souffrance inutile.

**20277** Les amyloses sont des maladies rares caractérisées par l'accumulation de protéines aux structures tertiaires instables, conduisant au mauvais repliement de ces protéines qui s'agrègent sous forme de dépôts amyloïdes. Ces fibrilles amyloïdes peuvent se former dans quasiment tous les tissus et organes ; le rein et le cœur (dans 70% des cas chez l'homme), le foie et le système nerveux périphérique. Il n'y a pas de signes cliniques véritablement spécifiques pour un diagnostic précoce de l'amylose. Toutefois, les conséquences liées à l'infiltration des fibrilles conduisent à une défaillance progressive du fonctionnement des organes associés à d'importantes lésions avec une mise en jeu du pronostic vital. Les difficultés de diagnostic de cette pathologie sont liées non seulement à sa rareté, mais aussi au fait que les symptômes associés sont communs à de nombreuses autres pathologies plus fréquentes. Le seul critère de certitude pour le diagnostic à ce jour est l'histologie qui requiert une biopsie. Il existe plus d'une trentaine de formes d'amylose dont le typage dépend de la protéine constituant les dépôts amyloïdes. Les traitements des amyloses actuellement visent à éliminer la cause de la production de la protéine pathologique, mais ne sont pas capables d'éliminer les dépôts déjà présents sur les organes.

Notre expérience sur les maladies de dépôts (particulièrement sur les dépôts d'immunoglobulines monoclonales), a abouti à la création et au brevet d'une molécule thérapeutique présentant une affinité pour tout type de fibrilles amyloïdes et induisant l'élimination des dépôts par des cellules immunitaires. Des essais chez le petit animal sont nécessaires afin d'étudier le bon ciblage par la molécule thérapeutique des dépôts amyloïdes, sa biodistribution ainsi que son efficacité pour éliminer les dépôts.

Pour cela, deux modèles murins développant deux amyloses différentes ont été choisis. Le premier mime une des amyloses les plus courantes chez l'humain, et la plus utilisée chez la souris, l'amylose AA, pour laquelle nous pouvons contrôler l'apparition chez la souris par des injections intraveineuses de fibrilles amyloïdes ainsi que d'un agent inflammatoire. Le deuxième modèle correspond à une amylose ApoA-II (AApoAII), une forme rare et héréditaire chez l'homme, mais assez répandue chez la souris. Il s'agit ici d'un modèle transgénique commerciale possédant une délétion d'un gène impliqué dans la coagulation (Serpine-1 codant pour la protéine PAI-1) déjà bien décrit dans la littérature et ne présentant pas de phénotype apparent. Cependant, grâce à des collaborateurs parisiens, nous avons montré pour la première fois que ces souris pouvaient développer une amylose ApoA-II au cours de leur sénescence. Cette amylose se développe tardivement (>18 mois) et n'avait donc pas été détectée précédemment. L'intérêt de l'utilisation de ces deux modèles se justifie par : 1) les différents types d'amylose, témoignant de la reconnaissance de dépôts de nature différente par notre molécule, et 2) des atteintes dans différents organes. En effet, le modèle d'amylose AA développe de l'amylose essentiellement dans la rate et le foie, tandis que le modèle AApoA2 est capable de développer de l'amylose dans le rein et le cœur.

Des méthodes de suivi de l'apparition de la maladie seront également mises en place. Nous utiliserons plusieurs techniques peu invasives, comme des échographies ou de l'imagerie animale

par fluorescence, et des marqueurs seront recherchés par analyse biochimique dans le sérum et les urines afin de pouvoir confirmer la présence des dépôts amyloïdes dans les organes de nos souris. Une fois ces procédures réalisées, les organes de ces souris seront prélevés sur les animaux euthanasiés afin de réaliser une analyse des lésions histologiques sur différents tissus, la présence de la molécule thérapeutique sur les dépôts amyloïdes et la réduction de ces dépôts suite au traitement.

L'ensemble de ce projet va nécessiter l'utilisation de 380 souris. Ce projet répond aux exigences des 3R :

- Remplacement : Les modèles cellulaires ne permettent pas de reproduire la complexité de la pathophysiologie des amyloses. D'autre part, l'approche thérapeutique que nous souhaitons tester a principalement pour objectif de cibler les dépôts amyloïdes et de stimuler la réponse immunitaire face à ces dépôts, nécessitant de cette façon la totalité de l'organisme pour pouvoir étudier l'efficacité de notre traitement.

- Réduction : Nous avons déjà développé en partie ce type de modèle et bénéficions donc du recul et de l'expérience nécessaire pour limiter les besoins en animaux car de nombreuses expériences sont déjà au point. De plus, le suivi dès l'apparition de la maladie nous permettra d'explorer son évolution dans le temps, et ainsi limiter le nombre d'animaux à utiliser. Nos procédures sont peu invasives, ce qui nous permet de réaliser un maximum d'expériences sur un minimum d'animaux.

- Raffinement : Les animaux sont élevés dans des conditions d'hébergement qui respectent leur bien-être (contrôle de la température et de l'hygrométrie de l'environnement, densité d'animaux, présence d'enrichissement, change régulier des litières, eau et nourriture à volonté, surveillance quotidienne des animaux). Toutes les procédures sont réalisées de façon à limiter le stress et la souffrance des animaux (anesthésie au besoin, acclimatation progressive des animaux aux cages métaboliques, antalgique en cas de douleur).

**20278** La période des 1000 premiers jours de la vie est aujourd'hui considérée comme fondamentale dans le développement de l'individu et sa santé tout au long de la vie. C'est durant cette période que le microbiote intestinal, c'est-à-dire l'ensemble des microorganismes du tractus digestif humain, se met en place. S'il existe de plus en plus de preuves de son impact sur la santé future de l'individu, les données restent rares sur le rôle et l'importance des premières bactéries colonisatrices de l'intestin. Il est bien connu que chez les grands et très grands prématurés, le microbiote intestinal est pauvre par rapport aux nouveau-nés à terme. Très récemment, il a été montré une association entre la composition bactérienne de l'intestin à un mois de vie et le risque de décès ou d'un développement neurologique altéré à deux ans. S'agit-il d'une simple association ou d'une relation de causalité entre microbiote et développement de l'enfant ? Nous souhaitons donc étudier si les premiers microbiotes, à coloniser le tractus digestif du nouveau-né prématuré, peuvent influencer le développement des organes et la maturation immunitaire, avec des conséquences différentes sur la santé future de l'individu.

Dans notre projet, nous étudierons deux microbiotes de nouveau-nés prématurés, l'un associé à un développement normal à deux ans, et l'autre associé à une altération du développement à deux ans. Ces microbiotes seront transférés chez des souris nées sans microbiote et maintenues en isolateurs stériles. Pour cela, nous coloniserons par voie orale des souris gestantes sans microbiote pour permettre la transmission verticale du microbiote de la mère aux souriceaux. Pour imiter la vie réelle, certaines souris recevront 3 semaines plus tard un microbiote diversifié provenant d'enfants en bonne santé afin de permettre une diversification similaire à celle observée lors du sevrage chez les nourrissons.

Dans un premier temps (procédure 1), les animaux seront euthanasiés à différents moments de leur développement et nous analyserons l'impact du microbiote sur la maturation de l'intestin, des poumons, du cerveau et sur le développement immunitaire.

Dans un second temps (procédure 2), nous analyserons l'impact de ces 2 microbiotes, diversifiés ou non, sur le risque de développement d'une allergie alimentaire. Pour cela, à 5 semaines de vie

les souriceaux colonisés par l'un ou l'autre des microbiotes et maintenus en isolateur stérile, seront sensibilisées (souris tests) ou non (souris contrôles) avec un allergène alimentaire (protéines du lait de vache). Cette sensibilisation sera réalisée une fois par semaine pendant 5 semaines. L'allergie sera évaluée suite à l'administration directe de l'allergène une semaine après la dernière sensibilisation. Les souris seront mises à mort à la fin de l'étude pour prélever des organes afin d'étudier l'impact du microbiote sur le développement de l'allergie.

Dans un troisième temps (procédure 3), les souriceaux colonisés à la naissance par le microbiote associé à un plus haut risque d'allergie alimentaire, recevront dans la première semaine de vie, par voie orale, des souches bactériennes probiotiques en traitement préventif de l'allergie. Leur microbiote sera ensuite diversifié ou non. A 5 semaines de vie, les souriceaux maintenus en isolateur stérile seront sensibilisés ou non à un allergène alimentaire comme décrit ci-dessus. Les souris seront mises à mort à la fin de l'étude afin d'étudier l'intérêt d'une modulation précoce du microbiote par des probiotiques pour prévenir le développement de l'allergie.

Ce projet nécessitera 766 souris sur 5 ans.

Ce nombre rend compte des différents modèles (modèle de colonisation, modèle d'allergie, modèle d'allergie et traitement au probiotique) et groupes (2 types de microbiote, diversification ou non de ces microbiotes). La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de tenir compte du dialogue complexe microbiote-hôte en intégrant des données sur la composition des microbiotes intestinal et pulmonaire, sur le système immunitaire et le statut physiologique de différents organes (intestin, poumon, cerveau).

Ce nombre a été élaboré en respectant la règle des 3R. Remplacer : Les microbiotes testés ont été préalablement sélectionnés sur des données cliniques et seuls les probiotiques les plus prometteurs au regard des connaissances actuelles et d'une sélection préalable *in vitro* seront testés chez l'animal.

Réduire : Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Grâce aux données de la littérature, un calcul statistique a été réalisé afin d'évaluer le nombre d'animaux à inclure pour obtenir des résultats significatifs tout en minimisant ce nombre... Raffiner : ce projet comprend deux modèles. Un modèle de portage de bactéries (modèle léger) et un modèle d'allergie (modéré) dans lequel les souris sont sensibilisées à un allergène mais ne déclenche pas de symptômes tant qu'elles n'ont pas été soumises à l'allergène purifié. Le soin et le suivi des animaux seront évalués par des personnes compétentes et expérimentées, quotidiennement par le zootechnicien et de manière bi-hebdomadaire par l'expérimentateur. Des points limites bien définis à l'aide d'une grille de score sont mis en place avec euthanasie selon les scores atteints.

La prématurité est une importante priorité de santé publique dans le monde entier, avec des conséquences ultérieures sur la santé et des conséquences économiques et sociales majeures. Notre travail fournira une base de connaissances essentielle pour développer de nouvelles stratégies pour la gestion de la prématurité, comme l'administration précoce de probiotiques ou de prébiotiques pour permettre l'établissement du meilleur profil de microbiote, avec pour objectif de diminuer le risque de maladies ultérieures.

**20279** Le muscle squelettique représente chez l'Homme environ 40% du poids total et consomme 80% du glucose sanguin. A ce titre, c'est un régulateur clé de l'homéostasie énergétique du corps entier. Avec la forte augmentation de l'épidémie d'obésité et de maladies chroniques associées comme l'insulinorésistance et au cours du vieillissement, le maintien de la masse musculaire et du métabolisme devient crucial.

Des données récentes indiquent que les acides gras Furaniques (FuFAs) présents en faible quantité dans l'organisme pourraient avoir des effets bénéfiques sur la santé. Ces FuFAs qui sont apportés par l'alimentation (en particulier le poisson) ont des effets antioxydants, antimicrobiens et anti-inflammatoires. La sève de l'arbre *Hevea brasiliensis* qui sert à produire du latex est une source importante de FuFAs. Nos travaux réalisés sur une lignée de cellules musculaires montrent qu'un

type de FuFA augmente la synthèse des myotubes (fibres musculaires) de manière importante. Ainsi cet acide gras pourrait avoir des effets bénéfiques sur la santé en particulier chez les personnes âgées souffrant de perte musculaire (sarcopénie) ou chez des personnes insulino-résistantes.

L'objectif de cette étude est de confirmer chez la souris l'action positive de ce FuFA sur les muscles squelettiques. Nous avons choisi pour cette étude le modèle souris C57BL/6J car il s'agit d'un modèle d'étude classiquement utilisé au laboratoire et décrit dans la littérature : 20 souris mâles C57BL/6J (10 animaux par groupe) seront utilisées dans ce projet. Elles recevront ou non une supplémentation en FuFA-F2 pour une période de 3 semaines. Nous explorerons le phénotype et le métabolisme musculaire.

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

- « Remplacer » les modèles animaux : Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales puisqu'il s'agit d'analyses nutritionnelles et métaboliques.
- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats.
- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "endpoints"):

Nous allons porter une attention particulière au bien-être de nos animaux. La complémentation en FuFA devrait avoir un effet bénéfique sur les animaux. L'accès à l'eau et à une nourriture adéquate est vérifié tous les jours. Le suivi journalier des animaux et du poids toutes les semaines permettent d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... En cas de souffrance, les animaux seront euthanasiés.

**20280** L'utilisation du glucose par la cellule joue un rôle central dans le maintien et le devenir de la cellule. Nous nous intéressons à une des voies d'utilisation du glucose indispensable l'activation d'une voie de modification des protéines. Cette voie de modification est contrôlée par une protéine clef, qui est notre protéine d'intérêt. Une perturbation de cette voie de modification des protéines peut conduire au développement d'une gluco-lipototoxicité, celle-ci est associée à une inflammation importante pouvant mener à des maladies tels que le diabète de type 2 ou l'hépatocarcinome.

Dans ce contexte, les objectifs de notre projet sont de:

- caractériser le phénotype des lignées de souris invalidées pour la protéine clef
- déterminer le rôle et l'importance de cette voie métabolique au niveau du foie dans le développement de l'inflammation et des nodules hépatiques et de caractériser ces nodules hépatiques
- identifier les acteurs moléculaires et les voies de signalisation capables de prévenir la formation de ces nodules hépatiques et le développement d'une inflammation
- mieux comprendre les mécanismes conduisant à une hyperprolifération conduisant au développement des nodules et à terme possiblement à des hépatocarcinomes

Pour cela, nous utiliserons une lignée de souris génétiquement modifiée dont l'expression de notre protéine d'intérêt est invalidée. Le glucose étant le substrat de cette voie de modification des protéines, nous souhaitons réduire l'apport en sucres dans l'alimentation de ces animaux afin de déterminer les effets positifs sur l'inflammation, la sensibilité à l'insuline, le métabolisme du glucose ainsi que sur le développement de nodules lors de ce changement nutritionnel. Pour cela, les animaux seront soumis à l'âge de 13 à 15 jours et jusque 4 semaines ou 8 semaines à un régime faible en hydrates de carbones qui sera compensé par un apport calorique important en lipides. Sur le groupe de souris de 8 semaines, nous analyserons l'impact du changement nutritionnel sur les paramètres métaboliques en réalisant des tests fonctionnels non-invasifs comme le test de sensibilité à l'insuline et de tolérance au glucose. Nous utiliserons 240 animaux sur 5 ans.

Actuellement, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier l'importance des régimes alimentaires dans le développement de ces nodules qui est le résultat d'interactions complexes entre le nodule, son tissu d'origine et son environnement.

Tout au long de cette étude, nous serons attentifs à respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire ; Raffiner):

**Remplacer:** 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. Pour cela, nous suivrons de près les publications scientifiques sur le sujet. De plus, pour identifier les voies de signalisation et les mécanismes mis en place dans l'hyperprolifération, nous réaliserons en parallèle des expériences en culture d'hépatocytes.

**Réduire:** 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.

**Raffiner:** 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 d'apprécier l'importance du régime alimentaire dans le développement de l'inflammation et des nodules hépatiques dans un modèle murin.

**20281** Les méningites bactériennes sont des infections des méninges, les enveloppes qui entourent et protègent le cerveau. Elles peuvent évoluer extrêmement rapidement, entraînant des complications graves (surdité, atteinte du cerveau). L'infection commence par une septicémie, puis les bactéries présentes dans le sang, passent du sang vers le cerveau, en franchissant la barrière hémato-encéphalique qui protège normalement le cerveau, permettant ainsi le développement de la méningite. Notre projet de recherche vise à identifier les acteurs cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de la méningite en utilisant un modèle murin. Pour cela nous injectons des bactéries à (Streptocoque du groupe B) des souris contrôles et/ou modifiées génétiquement et nous suivons i) le devenir de ces bactéries *in vivo* et ii) le rôle de certains types cellulaires du système nerveux central au cours du processus infectieux. Notre projet nécessite donc l'utilisation d'animaux qui nous permettra d'identifier ces mécanismes ne pouvant être explorés *in vitro*.

Pour respecter le principe des 3R.

**Remplacement :** il existe des modèles de cellules endothéliales cérébrales en culture. Ces cellules reproduisent assez bien les spécificités des cellules endothéliales cérébrales *in vivo* ce qui nous permet d'étudier certains aspects du développement de la méningite dans des modèles *in vitro*. Cependant, il n'est pas possible de reproduire *in vitro* la complexité des barrières cérébrales qui font intervenir bien d'autres types cellulaires que les cellules endothéliales cérébrales pour lesquels il n'existe pas de modèle de cellules en culture. Notre projet implique donc l'utilisation d'animaux qui nous permettra d'identifier des mécanismes ne pouvant être explorées *in vitro*. Grâce au modèle animal, nous aurons par ailleurs une vue d'ensemble du processus physiopathologique tel que l'implication du système immunitaire, du complément, des protéines sériques... qui ne peuvent être appréhendés dans des modèles *in vitro*. Le modèle animal souris reproduit au mieux les caractéristiques du processus infectieux chez l'homme (colonisation des voies respiratoires, colonisation digestive, septicémie et méningite).

**Réduction :** le nombre d'animaux utilisés sera réduit au nombre minimum nécessaire et suffisant pour permettre l'analyse statistique des données. Au total un maximum de 1744 souris répartis en 4 procédures seront utilisées sur 4 ans.

**Raffinement :** Pour les expériences nécessitant d'infecter les souris, nous avons raffiné la méthodologie afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Ainsi, nous avons défini des points-limites qui ont été validés avec la structure locale chargée du bien-être animal, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Par ailleurs, nous

réaliserons certaines expériences d'infections ex vivo à partir de cellules cérébrales issues de souris. Ceci permettra d'éviter la souffrance animale liée à l'infection bactérienne.

Ce projet est un projet de recherche fondamentale qui permettra une meilleure compréhension de la physiopathologie des méningites et pourrait permettre à terme d'avoir des retombées appliquées en permettant le développement de nouvelles stratégies anti-infectieuses innovantes, un enjeu majeur de santé publique.

**20282** Parmi les tissus des organismes vertébrés, le muscle squelettique est l'un des plus remarquables parce qu'il possède de grandes capacités régénératrices, ce qui font de lui un organe très plastique. À l'origine de cette plasticité musculaire se trouve un réservoir de cellules souches, dont les plus étudiées à ce jour sont les cellules satellites qui, comme leur nom l'indique, se localisent en périphérie des fibres musculaires. La dioxine, un polluant organique et hautement toxique, a un impact sur les cellules souches du muscle squelettique et il a été démontré qu'il existe une différence de réponse face à la pollution au sein des sous-populations de cellules souches du muscle. Une partie d'entre elles semblent résistantes à la pollution et présentent un mécanisme de résistance unique, tandis que la majorité des cellules satellites y sont sensibles. Ceci interroge désormais sur le rôle respectif de ces deux sous-populations quant à la réparation du muscle squelettique dans un contexte de pollution. Comme la pollution est un facteur de risque important pour la santé humaine nous proposons avec ce projet et sur la base de nos résultats, de décrypter les réponses cellulaires et moléculaires spécifiques de chacune de ces deux sous-populations au cours de la régénération musculaire après une exposition à la pollution. Alerter sur les effets de la pollution dans un système biologique tel que le système musculaire permettra de comprendre quel stress cellulaire peut engendrer la pollution. Dans notre étude, nous utiliserons des modèles murins qui subiront une exposition à la dioxine ou à une molécule contrôle. Une partie des souris sera, dans un deuxième temps, soumise à une blessure musculaire. Nous pourrons ainsi étudier l'impact de la pollution par dioxine sur les cellules souches musculaires notamment au cours du processus de la régénération musculaire. Comme notre projet s'intéresse à des processus biologiques qui reposent sur l'évolution au cours du temps et l'interaction entre de nombreux types cellulaires nous ne pouvons pas mettre en place une méthode alternative au vivant. Dans un but de suivre le principe des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) et de réduire l'utilisation excessif d'animaux, le nombre d'animaux a été calculé sur la base de protocoles déjà publiés avec 15 animaux par lot ce qui est le minimum pour obtenir suffisamment de matériel biologique pour réaliser l'ensemble des analyses nécessaires. Pour essayer de minimiser la souffrance et le stress induit aux animaux, des analgésiques seront administrés avant et après d'induction de la régénération musculaire. De plus, de la nourriture humidifiée sera ajoutée dans les cages les 3 premiers jours pour faciliter l'alimentation des animaux. Notre étude fera appel à un total de 480 souris sur une procédure expérimentale.

**20283** Notre projet « Rôle du tissu adipeux brun dans la dépense d'énergie dépendant des hormones thyroïdiennes chez la souris mâle adulte » est à finalité de recherche fondamentale.

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. Chez la souris les hormones thyroïdiennes peuvent agir soit dans le cerveau où elles stimulent des nerfs qui à leur tour stimulent les organes responsables de la dépense énergétique, soit directement dans ces organes 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, ce tissu produit des hormones thyroïdiennes, 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.

Des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation des hormones thyroïdiennes uniquement dans le tissu adipeux brun, ont été obtenues. Ces souris ont une température corporelle normale mais ont besoin d'un apport alimentaire plus important lors d'une exposition au froid (4°C) pour maintenir leur température corporelle. D'autre part lorsqu'hébergés à 23°C, qui représente un petit stress thermique chez les souris, ces animaux génétiquement modifiés sont résistants à l'obésité lorsque nourris avec un régime riche en gras et en sucre, alors que des souris témoins deviennent obèses dans les mêmes conditions. Ces observations suggèrent que les souris mutantes dépensent plus d'énergie que des souris contrôles pour maintenir leur température corporelle, ce qui nécessite qu'elles aient une prise alimentaire plus forte, et qui limite leur prise de poids. A une température d'animalerie de 30°C, température à laquelle les souris n'ont pas besoin de produire de chaleur pour maintenir leur température corporelle, les mêmes souris mutantes deviennent aussi sensibles à l'obésité que les souris contrôles. L'ensemble des résultats suggèrent que l'absence de signalisation thyroïdienne dans le tissu adipeux brun, entraîne une dépense énergétique accrue à 23°C mais pas à 30° qui représente la thermoneutralité. Afin de tester cette hypothèse, le but de ce projet est de mesurer directement la dépense énergétique chez ces souris mutantes aux deux températures.

**Bénéfices escomptés :** Ce projet permettra d'établir s'il existe un effet direct des hormones thyroïdiennes dans le tissu adipeux brun qui stimule la dépense d'énergie. A moyen terme, ce résultat serait d'importance en particulier dans le cadre de la lutte contre l'obésité. Les hormones elles même ne peuvent être utilisées à cette fin, à cause de leur effets indésirables sur d'autres tissus. Des analogues qui ciblent le tissu adipeux brun, comme il en existe ciblant le foie, pourraient constituer une nouvelle possibilité thérapeutique à tester.

Pour cette étude, l'invalidation de la signalisation thyroïdienne dans le tissu adipeux brun sera obtenue par injection intrapéritonéale quotidienne d'un composé nécessaire à l'obtention de la mutation chez l'adulte. La dépense d'énergie sera ensuite évaluée sur les mêmes souris à deux températures 23° puis 30°C, dans un système qui permet non seulement de mesurer la consommation d'oxygène, mais aussi l'activité spontanée, ainsi que les prises alimentaires et hydriques. Chaque mesure de dépense énergétique nécessite que l'animal soit isolé dans le système de mesure pendant trois jours. Il est remis avec ses congénères entre les deux mesures. **Remplacement :** Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle animal 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.

**Raffinement :** Un suivi adapté 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. Une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux, le transfert de litière quand l'animal doit être isolé et l'utilisation d'anesthésiques avant le prélèvement sanguin terminal permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Un enrichissement des cages lorsque les animaux sont rassemblés évite les bagarres. Le projet se déroule sur plusieurs animaleries, le transport se fera dans des cages permettant de conserver le confinement, selon les conditions règlementaires

**Réduction :** 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 32 souris. A l'issue de l'expérimentation l'ensemble des animaux sont mis à mort pour échantillonner les différents tissus d'intérêt. L'unique procédure est classé de sévérité modérée.

**20284** Le virus de l'herpès simplex de type 1 (HSV-1) provoque une kératite herpétique (KH) lorsqu'il infecte la cornée, étant ainsi la principale cause de cécité infectieuse dans les pays industrialisés. En France, près de 100 000 patients souffrent de KH récidivante, avec près de 20 000 épisodes survenant par an.

Chez l'humain, la primo-infection par HSV-1, asymptomatique dans 94% des cas, survient dans et autour de la bouche et du nez. En quelques heures, le virus se réplique au site d'infection puis

infecte les neurones des ganglions trijumeaux (TG) où il entre en latence. La réplication virale s'arrête, mais les génomes viraux persistent toute la vie de l'hôte. La réactivation du virus, à partir de cet état latent, peut survenir lorsqu'une personne subit divers facteurs de stress (fatigue, fièvre, déficit immunitaire, etc.). Cette réactivation génère de nouvelles particules virales qui migrent via les axones des nerfs infectés et infectent ainsi des sites distants tels que les yeux, les lèvres et le nez, et le cerveau. C'est dans ces sites que l'infection virale provoque des atteintes cliniques y compris la KH au niveau de la cornée.

Les molécules antivirales inhibent la réplication virale avec une efficacité de 50%, et n'empêchent donc pas les récurrences de la maladie. Cette protection incomplète facilite également la sélection de mutants résistants à ces molécules. Aucun vaccin n'existe pour traiter le HSV-1, malgré 40 ans de recherche sur le sujet. Les vaccins expérimentaux sont prometteurs contre la phase aiguë de la maladie, mais ils ne protègent pas contre l'établissement d'une infection latente, les événements de réactivation ou la persistance virale. Par conséquent, il est nécessaire de comprendre comment une infection latente peut être contrôlée, pour arrêter la maladie.

Le rôle du système immunitaire dans le contrôle d'HSV-1 est bien étudié. Cependant, les mécanismes qui contrôlent l'équilibre entre la latence et la réactivation ne sont pas connus. Malheureusement, les modèles *in vitro* ne peuvent pas reproduire les processus immunologiques impliqués dans l'établissement et le contrôle de la latence et de la réactivation du virus. Par conséquent, des études *in vivo* sur des modèles animaux sont nécessaires. Nous disposons d'un modèle murin de la maladie infectieuse à HSV-1 et de l'état latent, qui reproduit fidèlement l'histoire naturelle de l'infection et de la maladie observée chez l'humain, en particulier la phase de latence de l'infection. En utilisant ce modèle, nous avons établi un moyen de bloquer le virus dans un état latent, sans capacité de réactivation.

Notre projet vise à déterminer les mécanismes immunitaires impliqués dans cette latence dépourvue de capacité de réactivation. Pour atteindre cet objectif, les animaux infectés par la souche virulente d'HSV-1 seront soit préalablement inoculés avec des stimulateurs spécifiques de l'immunité ((Poly(I:C), R848, Alpha-Galactosylcéramide, virus inactivé, protéines virales) et soit déplétés de certains effecteurs immunitaires à l'aide d'anticorps monoclonaux. Nous évaluerons l'impact de ces procédures sur les signes cliniques de maladie aiguë et la réactivation. Les phénomènes immunitaires essentiels dans le contrôle des pathologies induites par HSV-1, sont les cibles de notre étude. La compréhension de ces processus permettra le développement de stratégies pour prévenir la réactivation d'HSV-1 et ses conséquences cliniques.

Des calculs de puissance statistique ont été utilisés pour déterminer le nombre minimum d'animaux requis pour obtenir des résultats expérimentaux significatifs. Ainsi, nous estimons que 1509 souris sont nécessaires pour cette étude (dont la durée est de 5 ans). Il n'y a pas de procédures invasives requises dans notre stratégie, et la souffrance des animaux est minimisée en effectuant toutes les procédures sous anesthésie générale, par des techniciens formés, validées par un vétérinaire. Pendant la phase aiguë de l'infection, (des points limites sont établis), les souris reçoivent des analgésiques en continu pour minimiser toute douleur potentielle. Elles sont surveillées après toutes les procédures, pendant la phase aiguë (surveillance tous les deux jours) et après la phase aiguë (surveillance hebdomadaire), car le virus reste à l'état latent et ne cause aucun symptôme. La prévention de la survenue d'une maladie après une infection par le HSV-1 nécessite la suppression des événements de réactivation. Notre étude déterminera l'exigence immunitaire minimale pour l'établissement d'un état latent non réactivant, les mécanismes qui régissent son établissement et la compréhension de la façon de l'exploiter pour de futures études sur les vaccins.

**20285** Les eczémas allergiques tels que l'eczéma de contact (colorants, produits chimiques, nickel...) ou l'eczéma atopique (acariens, moisissures, poils de chien/chat...) se caractérisent par des lésions cutanées et sont dues à une réaction allergique. Ces eczémas touchent plus de 15% de la population.

La cause des eczémas est complexe et reste mal comprise à ce jour. Ces dernières années, une population de cellules, les lymphocytes T mémoires résidents dans les tissus a été mise en



évidence. Ces lymphocytes ne recirculent pas dans l'organisme et patrouillent dans la peau à l'interface entre l'organisme et l'environnement. Ils sont notamment impliqués dans la récurrence et la sévérité de l'eczéma.

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'impact de l'injection d'anticorps dans un modèle d'eczéma allergique de contact et de voir comment cela peut améliorer la maladie et impacter certaines populations cellulaires spécifiques de tissus.

Pour ce faire, nous utiliserons un modèle bien connu d'eczéma allergique induit par l'application d'un chimique sur le ventre rasé de souris, puis 5 jours plus tard ce même chimique est réappliqué sur les oreilles. L'anticorps qui sera testé dans ce modèle sera injecté par voie intrapéritonéale à raison de 2 injections par semaine pendant 3 semaines. La mesure de l'inflammation se fera par mesure de l'épaisseur des oreilles des souris.

Les expériences ont été conçues en accord avec la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). En effet, nous projetons de réduire le nombre de souris utilisé tout en préservant la robustesse des analyses statistiques, nous envisageons donc d'utiliser 180 souris, âgées de 8 à 10 semaines au début des protocoles. Aucun test *in vitro* (remplacement) ne permet d'intégrer la réaction immunitaire de la peau et des organes immunitaires associés dans leur ensemble dans le cadre de l'allergie.

Le bien-être des animaux (raffinement) est également pris en compte, les animaux seront hébergés par groupes d'individus compatibles, dans des conditions contrôlées avec la mise en place d'une diversification du milieu (ajout de papier, d'une maisonnette et de tubes en plastique). Dans le cadre de ce projet, les animaux seront anesthésiés pour chaque geste entraînant ou pouvant entraîner un stress ou une douleur pour 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 soins et les procédures seront réalisés par du personnel qualifié.

**20286** Ce projet est un projet de recherche fondamentale sur le système nerveux.

L'hormone thyroïdienne est essentielle pour le développement du cerveau. Un défaut de signalisation thyroïdienne pendant le développement est susceptible d'induire des dégâts irréversibles sur le cerveau, les conséquences pouvant aller d'un léger retard mental jusqu'à des troubles neurologiques majeurs impactant fortement les activités motrices et intellectuelles. Bien que ces effets soient connus depuis longtemps, les mécanismes qui sous-tendent l'action de l'hormone thyroïdienne dans le cerveau ne sont pas encore connus, ce qui limite fortement les approches thérapeutiques envisageables pour les patients. Il est désormais connu que les principaux neurones inhibiteurs du cerveau sont des cibles majeures de l'hormone thyroïdienne au cours du développement.

L'objectif de ce projet est d'approfondir l'étude de l'action de l'hormone thyroïdienne dans ces neurones inhibiteurs, en utilisant des lignées de souris génétiquement modifiées permettant de bloquer la signalisation thyroïdienne spécifiquement dans ces neurones. En complément, nous souhaitons également explorer quel est l'effet d'une inactivation de la signalisation thyroïdienne dans les neurones excitateurs, en utilisant le même style de lignées de souris génétiquement modifiées.

La compréhension des mécanismes d'action de l'hormone thyroïdienne au cours du développement du cerveau permettra, à terme, de proposer des pistes de traitement adaptées aux différentes pathologies qui peuvent affecter la signalisation thyroïdienne.

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux car il est actuellement impossible de reproduire le développement du cerveau *in vitro*.

Certaines des lignées de souris nécessaires pour ce projet sont déjà disponibles, d'autres devront être générées spécifiquement pour ce projet, par croisement de lignées existantes. La création de lignées sera accompagnée d'un suivi rapproché de l'état des animaux, depuis la naissance jusqu'à l'âge adulte, pour détecter le plus précocement possible d'éventuelles atteintes au bien-être animal. Parmi les lignées de souris déjà disponibles, deux sont caractérisées par l'apparition de crises

d'épilepsie au cours de la deuxième semaine de vie, certaines de ces crises pouvant être fatales, notamment lorsqu'elles surviennent sur des individus déjà faibles. Les souris de ces lignées seront inspectées quotidiennement de manière approfondie, de manière à abréger les souffrances des souriceaux les plus affaiblis par les crises d'épilepsie. Des points limites précis ont été définis pour le suivi de ces lignées. Après cette phase critique, les crises d'épilepsie deviennent rares et les souris atteignant l'âge adulte ne semblent pas présenter de trouble susceptible d'affecter leur bien-être.

Dans une autre lignée de souris, l'inactivation de la signalisation thyroïdienne est moins drastique, si bien que les souris ne présentent pas de symptôme particulier. Cependant, il est probable que ces lignées présentent également des défauts de développement du cerveau, potentiellement associés à des altérations du comportement. Si des effets sur le cerveau sont confirmés, des souris de cette lignée seront soumises à des tests de comportement non invasifs (interactions sociales, enregistrement des vocalisations, exploration d'environnements nouveaux, comportement locomoteur).

Enfin, dans une autre lignée de souris, le blocage de la signalisation thyroïdienne est déclenché dans les cellules d'intérêt par l'injection d'un produit. Cette lignée nous permettra de préciser à quel moment l'action de l'hormone thyroïdienne est nécessaire pour le développement normal du cerveau.

Une partie des procédures consistera à étudier l'impact du blocage de la signalisation thyroïdienne dans les types de neurones choisis (neurones inhibiteurs ou neurones excitateurs, selon les procédures), en analysant l'expression des gènes dans différentes régions du cerveau, ainsi qu'en observant des coupes de cerveau au microscope (histologie). Enfin, d'autres souris serviront à fournir des neurones dont les propriétés seront étudiées *in vitro*.

Le prélèvement de cerveau pour l'histologie nécessite une étape de chirurgie dans les minutes qui précèdent la mort de la souris. Pour cette étape, les souris seront anesthésiées profondément.

Le nombre total de souris prévues pour ce projet est de 688. Ce nombre maximal inclut la possibilité de reproduire les expériences en cas d'imprévu, donc il est très vraisemblable que le nombre réel d'animaux utilisés sera inférieur à ce nombre maximal. De plus, certaines procédures ne seront pas réalisées si les résultats de procédures précédentes montrent que l'intérêt de poursuivre l'étude d'un modèle donné est limité. Enfin, nous prévoyons de valoriser au maximum les animaux utilisés, en constituant des banques de matériel biologique qui pourront être utilisées pour répondre à d'autres questions sur ces mêmes modèles.

**20287** Avec une fréquence de 4.000 à 100.000 plaies de main par an, elles demeurent des lésions très fréquentes et sont associées aux lésions des pédicules neurovasculaires palmaires dans 13 à 14.7% de cas, en raison de leur situation anatomique superficielle. Avec des diamètres allant de 1 à 2 mm, les artères digitales nécessitent le plus souvent des techniques microchirurgicales en cas de plaie.

Si de nombreuses méthodes ont été décrites expérimentalement, la technique la plus utilisée dans la pratique clinique pour réaliser une anastomose microvasculaire reste des points de sutures de nylon très fin étroitement espacés. Avec plus de cinquante ans de recul, les résultats cliniques obtenus avec cette technique sont devenus de plus en plus satisfaisants au fil du temps, notamment avec l'amélioration de l'équipement microchirurgical et de la formation. Cependant, une telle technique peut être difficile et traumatisante pour la paroi du vaisseau. En fait, les nombreux points de suture peuvent être responsables d'un rétrécissement de la lumière artérielle, d'une irritation de l'intima et d'une ischémie des berges, qui peuvent mener à la thrombose intravasculaire. De plus, une telle réparation prend du temps, particulièrement dans les plaies multiples de main avec plusieurs artères sectionnées or on sait que le facteur temps est primordial dans les réimplantations digitales, plus la chirurgie est longue plus les chances de succès diminuent.

En produisant un caillot physiologique de fibrine, la colle biologique à base de fibrine imite les étapes finales de la coagulation. Un tel matériel a gagné en popularité parmi la communauté de chirurgie

de main au cours des vingt dernières années, en particulier dans la gestion des plaies des nerfs. Cependant, malgré plusieurs articles expérimentaux et cliniques avec des résultats positifs concernant son utilisation pour les anastomoses microvasculaires, ses applications potentielles dans la chirurgie de la main n'ont pas encore été définies.

Le but de la présente étude est d'évaluer la possibilité de réaliser des microanastomoses artérielles termino-terminales de différents diamètres en combinant un nombre minimal de points de sutures nécessaires au rapprochement des berges associées à de la colle à base de fibrine, et de comparer les résultats obtenus avec des anastomoses utilisant la technique conventionnelle de microsuture. L'objectif étant de voir si l'utilisation de la colle permettra d'obtenir des anastomoses de meilleure qualité mais aussi d'obtenir un gain de temps.

Notre projet a été défini en conformité avec les exigences de la règle des 3R :

Remplacement : nous avons préalablement testé l'utilisation de la colle biologique dans plusieurs sutures microvasculaires sur des animaux décédés qui avaient été utilisés au préalable dans un autre projet.

Réduction : afin d'avoir un nombre suffisant d'anastomoses permettant de comparer les deux techniques (fils et fils + colle) selon différents diamètres de microvaisseaux tout en utilisant le moins d'animaux possibles nous réaliserons plusieurs sutures sur le même animal.

Raffinement : Pour assurer le bien-être des rats, dès leur arrivée ils seront placés en cage groupés par 3 dans un milieu enrichi (papier absorbant, rouleaux cartonnés). Tous les animaux seront sous anesthésie générale adaptée et sous analgésie. Des points limites ont été établis conduisant à la mise à mort anticipée si nécessaire. Aussi, pour éviter toute souffrance tous les animaux seront euthanasiés à l'issue de la procédure.

Au total, nous avons prévu l'utilisation de 11 rats : 7 animaux afin de réaliser 56 anastomoses au total (8 anastomoses par animal, 28 pour chaque groupe) + 4 rats sont prévus en plus en cas d'exclusion d'animaux avant la fin de la procédure à cause d'une atteinte de points limites.

## **20288** Contexte scientifique :

L'utérus permet d'accueillir le nouveau-né pendant la grossesse. En cas de naissance impossible par les voies naturelles, il doit être incisé, créant ainsi une cicatrice. Il s'agit de la césarienne, qui est une opération chirurgicale courante en médecine humaine ou vétérinaire. En France, chez la femme, la césarienne représente environ 20% des naissances. Les phénomènes de cicatrisation utérine sont mal identifiés. Dans certains cas l'utérus peut mal cicatrifier. Cela est susceptible de créer une zone de faiblesse, ou un défaut d'accolement avec une zone de déhiscence sur la cicatrice utérine. L'une des complications les plus graves de l'utérus cicatriciel est la rupture utérine qui correspond à une ouverture de la cicatrice utérine lors d'une grossesse ultérieure. Il s'agit d'une urgence extrême qui nécessite une césarienne afin de pouvoir sauver le nouveau-né et limiter l'hémorragie chez la mère. Elle peut survenir à tout moment de la grossesse mais le risque est accru pendant les contractions. L'ocytocine est une hormone qui permet d'induire des contractions et son utilisation en cours de travail majore le risque de rupture utérine.

Objectifs :

Nous avons prévu de réaliser une étude ayant pour but d'améliorer les connaissances sur la cicatrisation utérine et de proposer des stratégies de renfort utilisables pendant les césariennes. L'objectif est d'apporter un bénéfice en médecine humaine et vétérinaire.

Il n'existe pas à ce jour de modèle animal de rupture utérine. Pour mener à bien cette recherche, nous avons choisi le lapin, un mammifère de petite taille, couramment utilisé pour son appareil reproducteur, qui est donc connu et étudié. De plus la taille de ses organes reproducteurs est suffisante pour permettre la réalisation d'une cicatrice utérine et le suivi échographique de celle-ci. Le caractère bicornue de l'utérus du lapin (deux cornes utérines indépendantes) en fait un modèle permettant de réaliser un contrôle et un témoin sur le même animal.

Dans un premier temps, nous étudierons, après une césarienne préalable, l'impact de deux modalités de contraintes sur la cicatrice de l'utérus (mécanique ou hormonale) lors d'une seconde gestation. Les lapines seront transportées en cages individuelles dans l'unité de chirurgie. Sous anesthésie générale et traitement analgésique, nous avons prévu de créer une incision large sur toute la longueur de l'une des deux cornes des lapines au 3ème tiers de la gestation (corne cicatricielle). L'autre corne, sera considérée comme témoin. Les lapereaux et placentas seront extraits dans la mesure de possible par la corne cicatricielle. En cas de difficulté pour extraire les lapereaux de la corne témoin, une courte incision pourra être réalisée à la base de la corne témoin. Après réveil, les lapines recevront des traitements antalgiques et antibiotiques prophylactiques. Elles seront re-transportées dans l'unité de surveillance post opératoire où nous pourrions étudier la progression de la cicatrisation au moyen d'échographies réalisées sur animaux vigiles grâce à une contention par un lange. Après un délai de cicatrisation défini, les lapines seront remises à la reproduction. Pour la contrainte mécanique, les lapines seront euthanasiées et les utérus seront prélevés pour être soumis à une contrainte mécanique puis des échantillons seront prélevés pour analyse histologique. Pour la contrainte hormonale, les lapines en fin de gestation seront à nouveau transportées en cages individuelles à l'unité de chirurgie. Elles seront anesthésiées avec analgésie en pré-médication pour soumettre les deux cornes de l'utérus à une contrainte hormonale (ocytocine).

Pour ce faire, l'intégralité de cette procédure sera réalisée au maximum sur 55 lapines (contrainte mécanique et contrainte hormonale).

Dans un deuxième temps, nous souhaitons trouver des solutions pour consolider l'utérus, améliorer la cicatrisation, et limiter le risque de rupture utérine. Nous choisirons donc la procédure de rupture utérine la plus adaptée selon les résultats de la première procédure. Nous réaliserons à nouveau cette procédure en ajoutant un renfort mécanique à la cicatrice utérine. Nous prévoyons donc de tester différents processus (technique de suture, matériel de consolidation, prothèses résorbables...) permettant de favoriser la cicatrisation utérine. Pour cette seconde étape, nous prévoyons d'avoir recours à 39 lapines.

Le nombre total d'animaux utilisés sera donc de 94 lapines.

La puissance statistique correspond à la possibilité de ne pas trouver une différence dans nos résultats alors que cette différence est réelle. Nous l'avons fixé à au moins 80% et le nombre d'animaux utilisés a été calculé en fonction.

Conformité à la règle des 3R :

Remplacer : Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet car les phénomènes de cicatrisation ne peuvent être modélisés *in vitro*.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum, et ce nombre pourra être réduit en cas de résultats significatifs obtenus plus précocement. Le caractère bicorne de l'utérus de lapin nous permet de réaliser un témoin sur le même animal et donc de diviser notre nombre d'animaux par 2. Les lapereaux seront euthanasiés et l'utilisation des tissus sera mutualisée dans le cadre d'autres protocoles de recherche.

Raffiner : Les procédures seront réalisées sous anesthésie et analgésie afin de préserver le bien-être animal. Une surveillance pré et post opératoire quotidienne sera réalisée selon un protocole strict avec définition de points limites. Une grille de score sera utilisée pour aider à évaluer l'impact de la chirurgie et définir des points limites. Tous les gestes techniques seront réalisés par un chirurgien spécialisé. Toutes les précautions seront prises pour minimiser la souffrance. Les animaux seront hébergés en cages individuelles, sans contrainte dans le plus strict respect de la Directive Européenne de 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participeront à l'enrichissement du milieu pour assurer le bien-être des animaux. Celui-ci sera complété par l'apport d'objets dans l'environnement. Ce dernier est strictement contrôlé et maintenu stable (bruits, odeurs, lumière, température, hygrométrie). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter le plus rapidement possible d'éventuels signes d'altération de leur santé ou de leur bien-être. Le cas échéant, nous ferons appel à un vétérinaire référent afin de les

prendre en charge immédiatement, soit par des traitements adaptés soit par un arrêt de l'expérimentation.

## **20289** Contexte scientifique :

L'utérus permet d'accueillir le nouveau-né pendant la grossesse. En cas de naissance impossible par les voies naturelles, il doit être incisé, créant ainsi une cicatrice. Il s'agit de la césarienne, qui est une opération chirurgicale courante en médecine humaine ou vétérinaire. En France, chez la femme, la césarienne représente environ 20% des naissances. Les phénomènes de cicatrisation utérine sont mal identifiés. Dans certains cas l'utérus peut mal cicatriser. Cela est susceptible de créer une zone de faiblesse, ou un défaut d'accolement avec une zone de déhiscence sur la cicatrice utérine. L'une des complications les plus graves de l'utérus cicatriciel est la rupture utérine qui correspond à une ouverture de la cicatrice utérine lors d'une grossesse ultérieure. Il s'agit d'une urgence extrême qui nécessite une césarienne afin de pouvoir sauver le nouveau-né et limiter l'hémorragie chez la mère. Elle peut survenir à tout moment de la grossesse mais le risque est accru pendant les contractions. L'ocytocine est une hormone qui permet d'induire des contractions et son utilisation en cours de travail majore le risque de rupture utérine.

### Objectifs :

Nous avons prévu de réaliser une étude ayant pour but d'améliorer les connaissances sur la cicatrisation utérine et de proposer des stratégies de renfort utilisables pendant les césariennes. L'objectif est d'apporter un bénéfice en médecine humaine et vétérinaire.

Il n'existe pas à ce jour de modèle animal de rupture utérine. Pour mener à bien cette recherche, nous avons choisi le lapin, un mammifère de petite taille, couramment utilisé pour son appareil reproducteur, qui est donc connu et étudié. De plus la taille de ses organes reproducteurs est suffisante pour permettre la réalisation d'une cicatrice utérine et le suivi échographique de celle-ci. Le caractère bicorné de l'utérus du lapin (deux cornes utérines indépendantes) en fait un modèle permettant de réaliser un contrôle et un témoin sur le même animal.

Dans un premier temps, nous étudierons, après une césarienne préalable, l'impact de deux modalités de contraintes sur la cicatrice de l'utérus (mécanique ou hormonale) lors d'une seconde gestation. Les lapines seront transportées en cages individuelles dans l'unité de chirurgie. Sous anesthésie générale et traitement analgésique, nous avons prévu de créer une incision large sur toute la longueur de l'une des deux cornes des lapines au 3ème tiers de la gestation (corne cicatricielle). L'autre corne, sera considérée comme témoin. Les lapereaux et placentas seront extraits dans la mesure de possible par la corne cicatricielle. En cas de difficulté pour extraire les lapereaux de la corne témoin, une courte incision pourra être réalisée à la base de la corne témoin. Après réveil, les lapines recevront des traitements antalgiques et antibiotiques prophylactiques. Elles seront re-transportées dans l'unité de surveillance post opératoire où nous pourrions étudier la progression de la cicatrisation au moyen d'échographies réalisées sur animaux vigiles grâce à une contention par un lange. Après un délai de cicatrisation défini, les lapines seront remises à la reproduction. Pour la contrainte mécanique, les lapines seront euthanasiées et les utérus seront prélevés pour être soumis à une contrainte mécanique puis des échantillons seront prélevés pour analyse histologique. Pour la contrainte hormonale, les lapines en fin de gestation seront à nouveau transportées en cages individuelles à l'unité de chirurgie. Elles seront anesthésiées avec analgésie en pré-médication pour soumettre les deux cornes de l'utérus à une contrainte hormonale (ocytocine).

Pour ce faire, l'intégralité de cette procédure sera réalisée au maximum sur 55 lapines (contrainte mécanique et contrainte hormonale).

Dans un deuxième temps, nous souhaitons trouver des solutions pour consolider l'utérus, améliorer la cicatrisation, et limiter le risque de rupture utérine. Nous choisirons donc la procédure de rupture utérine la plus adaptée selon les résultats de la première procédure. Nous réaliserons à nouveau cette procédure en ajoutant un renfort mécanique à la cicatrice utérine. Nous prévoyons donc de tester différents processus (technique de suture, matériel de consolidation, prothèses

résorbables...) permettant de favoriser la cicatrisation utérine. Pour cette seconde étape, nous prévoyons d'avoir recours à 39 lapines.

La puissance statistique correspond à la possibilité de ne pas trouver une différence dans nos résultats alors que cette différence est réelle. Nous l'avons fixé à au moins 80% et le nombre d'animaux utilisés a été calculé en fonction.

Conformité à la règle des 3R :

Remplacer : Le recours aux animaux est indispensable pour ce projet car les phénomènes de cicatrisation ne peuvent être modélisés *in vitro*.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum, et ce nombre pourra être réduit en cas de résultats significatifs obtenus plus précocement. Le caractère bicorne de l'utérus de lapin nous permet de réaliser un témoin sur le même animal et donc de diviser notre nombre d'animaux par 2. Les lapereaux seront euthanasiés et l'utilisation des tissus sera mutualisée dans le cadre d'autres protocoles de recherche.

Raffiner : Les procédures seront réalisées sous anesthésie et analgésie afin de préserver le bien-être animal. Une surveillance pré et post opératoire quotidienne sera réalisée selon un protocole strict avec définition de points limites. Une grille de score sera utilisée pour aider à évaluer l'impact de la chirurgie et définir des points limites. Tous les gestes techniques seront réalisés par un chirurgien spécialisé. Toutes les précautions seront prises pour minimiser la souffrance. Les animaux seront hébergés en cages individuelles, sans contrainte dans le plus strict respect de la Directive Européenne de 2010 relative à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Les contacts sociaux obtenus par l'hébergement des différents animaux dans des cages adjacentes participeront à l'enrichissement du milieu pour assurer le bien-être des animaux. Celui-ci sera complété par l'apport d'objets dans l'environnement. Ce dernier est strictement contrôlé et maintenu stable (bruits, odeurs, lumière, température, hygrométrie). Les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter le plus rapidement possible d'éventuels signes d'altération de leur santé ou de leur bien-être. Le cas échéant, nous ferons appel à un vétérinaire référent afin de les prendre en charge immédiatement, soit par des traitements adaptés soit par un arrêt de l'expérimentation.

**20290** Aujourd'hui, la greffe d'organe est souvent le dernier recours pour les patients dont les organes vitaux sont défaillants. La greffe permet de retrouver une qualité de vie et d'améliorer la survie des patients. Néanmoins, les traitements antirejet ont de nombreux effets secondaires (infections et cancers).

Le but de ce projet de recherche, prévu sur une période de 5 ans, est de développer une thérapie cellulaire et génique pour supprimer le besoin en anti-rejets. Il s'agit de modifier génétiquement les lymphocytes régulateurs du système immunitaire du receveur pour qu'elles neutralisent la réaction de rejet. Leur efficacité *in vitro* et *in vivo* a été établie. Il est désormais indispensable de démontrer et d'optimiser leur efficacité dans des modèles précliniques de greffe pour mieux garantir un effet protecteur à long terme, une étape nécessaire pour son utilisation future chez l'homme. Seul un modèle murin de transplantation est capable de récapituler la complexité des phénomènes de rejet. Trois types de modèle murins seront utilisés pour tester et optimiser l'utilisation de lymphocytes génétiquement modifiés en transplantation:

- 1- un modèle de maladie du greffon contre l'hôte, où le transfert de cellules immunes humaines chez des souris sans défense immunitaire (immunodéprimées) induit des lésions tissulaires,
- 2- un modèle de greffe de peau et un modèle de greffe d'ilots pancréatiques chez des souris de 12 semaines après la reconstitution de leur système immunitaire par des cellules humaines (souris humanisées).

Au total, 515 souris de trois lignées de souris seront utilisées, une lignée non immunodéprimée et deux lignées immunodéprimées. Ces 2 dernières lignées présentent un déficit immunitaire permettant la prise de greffe de cellules humaines. Elles permettent ainsi de tester l'efficacité d'immunothérapies sur des cellules humaines chez la souris. Dans les trois modèles, les souris

recevront un médicament de chimiothérapie par voie intra-péritonéale. Son effet toxique sur les cellules souches du sang de la souris libère l'espace pour permettre la greffe de cellules humaines. Dans le premier modèle, les souris seront surveillées par observation clinique, prélèvement sanguin hebdomadaire, imagerie sous anesthésie générale gazeuse. Au cours de la procédure, elles recevront une injection intra-veineuse de cellules humaines, et des injections intrapéritonéales de traceur lors des imageries. Elles seront sacrifiées dès l'apparition de signes manifestes de la maladie du greffon contre l'hôte. Dans les modèles de greffes de peau et d'ilots, les cellules humaines transférées induiront un rejet rapide. Les expériences testeront l'efficacité de l'immunothérapie à prévenir le rejet. Dans le modèle de greffe de peau, deux greffons de 6-8 mm de diamètre seront transplantés sur le dos sous anesthésie générale et antalgie, avant la mise en place d'un bandage de contention moyenne. Le traitement antalgique sera poursuivi une semaine jusqu'à l'ablation du pansement.

Dans le modèle de greffe d'ilots pancréatiques, ces derniers seront placés au cours d'une courte chirurgie sous anesthésie générale sous la capsule du rein, de souris diabétiques. Un traitement antalgique sera poursuivi 7 jours après la chirurgie.

Dans cette saisine, le principe des 3R a été suivi comme suit :

**Remplacer** : Des études fonctionnelles *in vitro* ont été réalisées avec des cellules humaines afin d'optimiser la préparation du produit de thérapie cellulaire. Toutes les étapes visant à améliorer la performance du vecteur de thérapie génique ont été mises au point *in vitro*.

**Réduire** : Afin de réduire le nombre d'animaux, les scores d'évaluation clinique les plus objectifs, prédictifs et robustes seront privilégiés. Le suivi par imagerie intravitale permet un suivi longitudinal des animaux et donc une réduction de leur nombre.

**Raffinement** : Afin de limiter la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, une surveillance rapprochée et l'utilisation d'antalgiques sont prévues. Des points limites ont été établis afin d'anticiper le sacrifice de l'animal si nécessaire. De plus, le milieu d'hébergement sera enrichi à l'aide de coton de nidification.

Les résultats seront partagés avec la communauté scientifique.

La prévention des réactions de rejet dans ces trois modèles complémentaires serait un argument préclinique très robuste et convaincant pour porter cette nouvelle stratégie vers une utilisation clinique.

**20291** Le succès de la transplantation hépatique comme traitement des maladies chroniques sévères du foie, a engendré une pénurie croissante d'organes disponibles pour la greffe. Afin de proposer un greffon hépatique au plus grand nombre de patients, la communauté de transplantation a aujourd'hui recours à des greffons hépatiques dits « marginaux ». Ce type de greffons est soumis à une période prolongée d'absence d'oxygène qui diminue rapidement les réserves énergétiques de l'organe. Ceci implique un plus grand risque de défaillance du greffon au moment de la transplantation ainsi qu'un risque accru de décès du patient après transplantation.

Dans ce contexte, un défi majeur consiste à optimiser la conservation de ces greffons marginaux avant la transplantation en les protégeant de la déplétion énergétique afin de réduire le risque de défaillance post-transplantation. Une approche innovante est l'utilisation des machines de perfusion qui permettent d'apporter de l'oxygène, des antioxydants et des substrats énergétiques au greffon avant la transplantation.

L'utilisation de ces machines a montré une amélioration de la fonction des greffons marginaux et une réduction des complications post-transplantation. Toutefois, il n'existe pas de données sur la séquence et les modalités d'utilisation optimale de ces machines. Les machines de perfusion doivent-elles être utilisées seules ou en complément d'une conservation statique standard dans la glace ? Leur intérêt est-il le même lorsqu'elles sont utilisées avant ou après la conservation statique standard ?

L'objectif de cette étude est d'identifier la meilleure stratégie de conservation permettant de protéger les greffons hépatiques marginaux avant la transplantation.

L'étude utilise un modèle porcin permettant de simuler les différentes modalités de conservation possible puis la greffe hépatique.

Le projet portera sur 48 porcs domestiques d'élevage qui seront répartis en 6 groupes de 8 animaux pour avoir un test statistique significatif. Les différents groupes correspondront à des modalités de conservation différentes (avec ou sans machine de perfusion, timing de perfusion différent).

Résultats attendus : Cette étude permettra d'évaluer la plus-value des machines de perfusion en termes de protection des greffons marginaux et de mettre en avant la meilleure façon de les utiliser. A noter que les différentes séquences étudiées sont toutes applicables en pratique clinique et les conclusions de notre étude permettront donc de changer la pratique en transplantation.

Le projet répond aux principes des 3Rs :

- Remplacement : A la place d'une transplantation hépatique chez des porcs receveurs, nous avons fait le choix de remplacer cette étape par une perfusion ex-vivo au sang oxygéné en utilisant une machine de perfusion. L'utilisation de ce modèle permet d'éviter le recours à un second animal. Par ailleurs, l'étude des lésions d'ischémie-reperfusion des greffons hépatiques est complexe et nécessite des analyses séquentielles par biopsies tissulaires et analyses sanguines répétées pendant le prélèvement, la conservation et après la reperfusion des greffons. Ces analyses sont donc trop invasives pour être réalisées directement chez l'humain. Elles ne peuvent pas non plus être réalisées chez le petit animal en raison d'un nombre important de prélèvement.

- Réduction : Comme énoncé précédemment, notre modèle de reperfusion ex-vivo ne nécessite pas de receveurs ni de donneurs de sang supplémentaires. De ce fait, nous réduisons par 2 le nombre d'animaux utilisés. La procédure expérimentale est par ailleurs actuellement maîtrisée et reproductible ne justifiant pas le recours à une période de training, diminuant nettement le nombre d'animaux. Cette standardisation a permis aussi d'obtenir un taux de succès de la procédure de 100% permettant de définir un nombre plus juste d'animaux nécessaire.

Après vérification de la mort de l'animal, nous réaliserons les prélèvements d'organes. Si l'objectif premier reste l'étude de la conservation du foie, les reins, voire d'autres organes, pourraient faire l'objet d'une étude complémentaire et donc d'un prélèvement post mortem. Cette démarche s'inscrit dans un souci de réduction afin d'optimiser les données recueillies sur un même animal.

- Raffinement : Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation adaptée de sujets habitués à l'homme, et la réalisation d'une anesthésie profonde dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. C'est aussi pour respecter ce principe qu'un modèle de perfusion ex-vivo du foie a été mis en place afin d'éviter la réalisation d'une procédure « sévère ». Enfin, l'utilisation des machines de perfusion ex-vivo, dans des conditions fidèles à la pratique clinique permet de former les praticiens à leur utilisation et présente ainsi un réel intérêt pédagogique.

**20292** Le traitement des hémopathies malignes par transplantation de cellules souches hématopoïétiques allogéniques peut induire des complications graves telle que la réaction du greffon contre l'hôte (GvHD). Plusieurs voies seraient susceptibles de prévenir la GvHD, dont la composition du microbiote intestinal, l'activité des lymphocytes T régulateurs (Treg) et la voie purinergique permettant, via CD39 et CD73, la dégradation de l'ATP pro-inflammatoire en adénosine immuno-suppressive.

Nous avons identifié une nouvelle population CD3+/CD4+/CD8αLOW/CCR6+/CXCR6+ de Treg humains, appelé DP8α, dont le TCR est spécifique de *Faecalibacterium prausnitzii*, une bactérie commensale du microbiote intestinal.

De plus, ces Treg exercent leur fonction suppressive via l'activité purinergique médiée par CD39 et CD73. Nous avons donc investigué le rôle potentiel de ces Treg dans la prévention de la GvHD chez 63 patients atteints d'hémopathies malignes ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques. De façon intéressante, la survenue de GvHD aigüe (n=21) était



fortement associée ( $p < 0,001$ ) avec un défaut d'expression de CD73 spécifiquement sur les Treg DP8 $\alpha$ . Ces résultats suggèrent qu'une altération de la fonction suppressive des Treg DP8 $\alpha$ , médiée par CD73, pourrait contribuer à la physiopathologie de la GvHD aiguë.

Afin de tester le rôle de ces Treg *in vivo*, nous avons utilisé, dans une première saisine validée, un modèle murin (souris NSG) pré-clinique dans lequel la xéno-GvHD a été induite par injection de cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) humain contenant ou non des Treg DP8 $\alpha$  à 3 différents ratios (3:1 ; 1:1 et 1:3) afin de déterminer si ces derniers peuvent limiter l'apparition de la GvHD. Pour poursuivre cette étude et maintenir la fonction suppressive des DP8 $\alpha$ , une injection répétée de ces cellules régulatrices sera réalisée de façon hebdomadaire dans cette saisine.

Au total, ce projet nécessitera 255 souris.

L'utilisation d'animaux pour l'évaluation de l'impact des Treg DP8 $\alpha$  sur la xéno-GvHD nous permettra de conforter nos observations cliniques et de valider *in vivo* les observations déjà obtenues dans un système beaucoup plus simple *in vitro*.

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. Nous testerons en 1er lieu un clone Treg DP8 $\alpha$  démontrant une forte capacité immunomodulatrice *in vitro* (100%), aussi si les résultats *in vivo* ne montrent pas d'activité immunomodulatrice de ce clone, alors les autres clones Treg DP8 $\alpha$  ne seront pas évalués.

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, un certain nombre de procédures seront réalisées 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 une évaluation quotidienne des signes généraux.

**20293** Pour évaluer le risque des produits chimiques pour l'homme, des études sont réalisées sur l'animal de laboratoire et soumises aux autorités réglementaires avec leur mise sur le marché.

Les études décrites dans ce projet correspondent aux études de toxicité à long-terme et aux études de cancérogenèse. Elles donnent des éléments d'information sur les risques pour la santé, susceptibles de découler d'une exposition répétée pendant une période pouvant couvrir la vie entière de l'espèce considérée.

Ce sont des études réglementaires et requises par les autorités pour toutes homologations de nouvelles molécules. Elles répondent à des lignes directrices internationales précises décrivant le protocole d'étude (durée, nombre d'animaux, paramètres...). L'évaluation de la toxicité chronique doit être réalisée sur 2 espèces de rongeurs (rat et souris). Lorsque cela est possible, l'essai de toxicité chronique et de cancérogenèse sont combinés afin de gagner en efficacité et de limiter le recours aux animaux tout en préservant la qualité des données.

Ces études viennent en complément d'information obtenues au préalable sur des modèles *in silico* et *in vitro*. Mais ne pouvant tester ces produits chez l'homme, ces informations complémentaires chez l'animal sont indispensables pour la réalisation de l'évaluation de risques pour l'homme. La détermination de la toxicité chronique et du pouvoir cancérogène n'est effectuée qu'après obtention des premiers résultats d'essais de toxicité à doses répétées menées sur des études *in vitro*, puis sur l'animal exposé à court terme et enfin pendant 28 jours et/ou 90 jours.

Le nombre d'animaux sera d'au maximum 960 rats et 840 souris par étude avec un démarrage d'une à 2 études par année soit un maximum pour 5 ans de 4800 rats et 4200 souris. Pour leur bien-être, les animaux seront hébergés avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux seront observés tous les jours (week-ends compris). Toutes les informations concernant les animaux sont enregistrées dans un logiciel. Des points limites spécifiques et adaptés à l'âge des animaux ont été définis par le laboratoire, ils conditionnent l'appel

à un vétérinaire du site pour un traitement ou l'euthanasie précoce de l'animal. A la fin de chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

Les différentes étapes (surveillance clinique, anesthésie, prélèvements, autopsie) seront effectuées par du personnel qualifié et expérimenté. Des points limites appropriés et validés par le comité d'éthique et la SBEA ont été mis en place dans chaque procédure

Ces études sont soumises à des réglementations, il est donc impossible de réduire le nombre d'animaux.

**20294** Chez les vertébrés, le système nerveux central (SNC, cerveau, tronc cérébral (TC) et moelle épinière (ME)) baigne dans le liquide cébrospinal (LCS) dont la composition est proche de celle du plasma avec la présence de molécules bioactives (ex. neurotransmetteurs, neurotrophines et signaux de l'immunité et inflammatoires). Le LCS représente un système de communication à large échelle grâce auquel une molécule bioactive libérée dans une région du système ventriculaire est susceptible de parcourir de longues distances et d'agir de manière globale sur le système nerveux central (SNC). De nombreuses études au cours de ces dernières décennies ont démontré que le LCS jouait un rôle primordial dans le développement et la physiologie du SNC ainsi que comme source d'information de son état physio-pathologique.

Au niveau du canal central (CC) du TC et de la ME, il existe une population neuronale unique (les neurones de contact du LCS, Nc-LCS) qui est à l'interface entre LCS et tissu nerveux et par conséquent en position stratégique pour assurer la détection et l'intégration des signaux circulant pour transmettre l'information recueillie vers des cibles qui restent à être identifiées. Les Nc-LCS représentent une population neuronale particulière par sa morphologie et ses caractéristiques et qui est conservée chez tous les vertébrés. Ces neurones sont présents le long du CC, projette une dendrite (fibre nerveuse) unique au contact du LCS et expriment de manière sélective le canal PKD2L1 qui joue un rôle de récepteur sensoriel. Son activité est modulée par la composition du LCS, son osmolarité, son flux ainsi que par la torsion de la ME. Les données récentes, obtenues chez les vertébrés inférieurs, indiquent que les Nc-LCS représenteraient un nouveau système sensoriel intrinsèque du SNC et capable d'en moduler l'activité en conditions physiologiques et/ou de l'informer en situations pathologiques.

Le projet de recherche que nous développons dans notre équipe vise à caractériser, pour la première fois chez le mammifère, les propriétés des Nc-LCS au niveau moléculaire et cellulaire, de déterminer les mécanismes régulant leur activité et quelles en sont les conséquences sur l'activité et la physiologie du SNC. Par ailleurs, nous menons une étude de leur connectivité afin d'identifier le réseau neuronal dans lequel ils sont insérés (partenaires pré- et post-synaptiques) et démontrer comment ce réseau régule l'activité des Nc-LCS. L'objectif final de cette étude sera de caractériser les propriétés des Nc-LCS dans des conditions plus physiologiques avec un minimum de perturbation de leur environnement et de démontrer les conséquences de leur manipulation sur la régulation de la physiologie du SNC et le comportement chez l'animal libre de ses mouvements.

Pour mener cette étude, qui comblera 6 procédures expérimentales pour un nombre total de 2610 souris (majoration de 5% en cas d'échec) sur une période de 5 ans, il est nécessaire de réaliser une analyse de la physiologie des Nc-LCS et plus largement du SNC que seule l'utilisation d'un modèle d'animal permet. Le projet sera mené en suivant strictement les procédures de la règle des 3R.

1) Réduction - Nous mettons en place une gestion rigoureuse de la production et de l'utilisation des animaux d'expérimentation pour réduire au strict minimum le nombre d'animaux utilisés pour chaque groupe expérimental et ce en fonction de contraintes de chaque technique expérimentale et des analyses statistiques. Afin de limiter ce nombre, nous privilégierons la génération d'animaux expérimentaux par des approches d'infection virale et pour les études comportementales nous mettons en place des protocoles où les animaux générés représenteront leur propre contrôle.

Enfin, pour optimiser le devenir des tissus prélevés, nous développons une banque de tissu qui pourra servir à nos études histologiques.

2) Remplacement – Notre projet est basé sur la compréhension de la physiologie d'une population neuronale peu connue, aussi le modèle animal et les approches transgéniques sont indispensables dans notre champ d'étude et rendent difficile l'utilisation de modèles alternatifs.

3) Raffinement - nous veillons à développer des procédures d'expérimentation limitant le stress, l'anxiété et toute souffrance animale et pour assurer un environnement enrichi pour les animaux et ainsi leur bien-être (nidification, jeu), la stimulation de leur curiosité et le maintien des relations sociales (animaux maintenus en groupe). Chaque fois que possible, nous réaliserons des études pionnières qui permettront d'optimiser les gestes chirurgicaux, les approches expérimentales et par là même de limiter les pertes potentielles d'animaux lors des procédures menées dans le cadre de notre étude. Lorsque des protocoles de chirurgie seront nécessaires, un traitement analgésique pré-opératoire sera utilisé et les animaux seront sous anesthésie générale et analgésie pendant toute la durée de l'intervention. Ils recevront un traitement anti-inflammatoire et antalgique post-opératoire et nous veillerons à leur assurer des conditions de réveil et de récupération optimales. Une observation journalière permettra de définir les points limites qui sont notamment l'apparence, la posture et le comportement. Toutes les précautions pour limiter le stress et la douleur des animaux seront également prise pendant les phases expérimentales et les animaux utilisés seront euthanasiés à la fin de l'étude.

Au vu du rôle primordial du LCS dans des conditions physiologiques mais également pathologiques, nous anticipons que le projet que nous développons permettra de mieux comprendre les propriétés des Nc-LCS, leur intégration au niveau des réseaux neuronaux bulbo-spinaux et leur fonction *in vivo*. Cette étude permettra de développer de potentielles pistes de recherche qui pourraient avoir des impacts au niveau thérapeutique.

**20295** Le but de cette unité d'enseignement (UE) de 2ème année du master Sciences du Vivant Parcours NeuroPhysiologie Appliquée est l'acquisition d'une formation pratique solide en neurosciences et physiologie permettant la mise en oeuvre des pratiques en matière d'expérimentation animale que les étudiants ont acquis au cours de l'UE de certification en matière d'expérimentation animale niveau Praticien sur Rongeurs qu'ils ont eu à suivre et valider lors de leur 1ère année de master. Au cours de cette UE, 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 et à gérer et mettre en oeuvre de manière autonome et/ou encadrée par des enseignants chercheurs confirmés en matière d'expérimentation animale deux protocoles expérimentaux comme il est fait dans les laboratoires agréés par les personnels habilités. Le projet mis en oeuvre dans cette saisine correspond à des approches expérimentales couramment utilisées dans les laboratoires de recherche en Neurosciences visant à étudier les effets comportementaux de l'absence de production d'androgènes suite à une castration et une supplémentation hormonale partielle ou complète en testsotérone. Il s'agira de réaliser une castration chirurgicale chez des rats prépubères (cette opération sera réalisée par des enseignants-chercheurs habilités en chirurgie) et à les supplémenter partiellement ou complètement en testostérone pour étudier les effets de la suppression complète ou partielle de la production d'androgènes sur différents aspects du comportement (activité, anxiété, comportement sexuel, comportement social). Par rapport aux principes de la règle des 3R, le recours à l'animal pour réaliser ce type d'expérimentation ne peut pas être substitué par des systèmes virtuels ou cellulaires, le but au niveau du master étant de former les étudiants à la pratique de l'expérimentation animale dans le champ des neurosciences (Remplacement). Le nombre total d'animaux mis en jeu sera de 96 rats par année, nombre estimé nécessaire et suffisant pour permettre l'étude du comportement qui nécessite des groupes d'animaux de taille adéquate afin de réaliser une analyse statistique convenable des résultats. Le nombre total d'animaux qui sera utilisé pour ce projet d'une durée de 5 ans sera donc de 480 rats. Chaque année, 64 rats (32 mâles et 32 femelles) seront utilisés uniquement pour permettre la réalisation des tests comportementaux d'étude du comportement sexuel et du comportement social qui seront réutilisés

dans le cadre d'autres TP (Réduction/raffinement). Pendant les TP, les étudiants certifiés auront à gérer le déroulement et la réalisation du projet et des différentes procédures qui le concernent dans le respect des règles fixées par les contraintes réglementaires et à assurer le bien-être des animaux dont ils seront garants (Raffinement). Les étudiants inscrits dans le master qui ne sont pas certifiés assisteront les étudiants certifiés dans le déroulement et la gestion des procédures sans pour autant intervenir sur les animaux (Raffinement). Enfin, ces TP seront encadrés par les enseignants-chercheurs de l'équipe pédagogique tous certifiés de niveau Concepteur sur Rongeurs et formés aux techniques utilisées, la procédure chirurgicale visant à castrer les animaux étant réalisée uniquement par des enseignants chercheurs habilités en matière de chirurgie (Raffinement). Les animaux seront surveillés quotidiennement et les points limites mentionnés dans la saisine relatifs à un état de mal-être persistant relevés (perte de poids corporel supérieure à 10% du poids de départ, perte de poids >20% sur 3 jours, état de stress apparent de l'animal se maintenant suite à la manipulation par les étudiants (maintien d'un comportement agressif, cris récurrents), tout signe de lésion suite à l'administration de la substance (saignement, difficulté respiratoire et/ou cardiaque), signes comportementaux anormaux (prostration, hyperactivité, signes d'agressivité vis-à-vis des congénères), signes apparents de mauvaise cicatrisation de la plaie). Les rats utilisés pour ces TP à l'exception de ceux utilisés pour les tests d'interaction sociale et de comportement sexuel seront mis à mort selon une méthode réglementaire alors que ceux utilisés pour l'étude du comportement sexuel et du comportement social seront conservés et pourront être utilisés dans le cadre d'autres actions de formation sur avis du personnel de l'EU et de la structure en charge du bien-être animal de l'établissement, au besoin complété par l'avis du vétérinaire référent. Ils ne seront mis à mort selon une méthode réglementaire qu'en dernier recours.

**20296** L'objectif du projet est d'étudier le rôle des cellules du sang (hématopoïétiques), par rapport aux cellules constituant les tissus (non hématopoïétiques), dans les réponses immunitaires et inflammatoires. Pour ce faire, on réalise une transplantation de moelle osseuse. Après irradiation pour éliminer les cellules hématopoïétiques, les souris reçoivent une injection par voie intraveineuse de cellules de moelle osseuse, qui contiennent des cellules souches qui vont permettre de reconstituer tout le système hématopoïétique de manière durable. Ceci est vérifié par le comptage des cellules sanguines, réduite après irradiation, mais revenues à la normale 8 semaines environ après reconstitution par les cellules de moelle osseuse. On appelle ces animaux des 'chimères' puisqu'ils contiennent les tissus du receveur et les cellules sanguines et hématopoïétiques issues du donneur de moelle osseuse. Un animal donneur permet de reconstituer une dizaine d'animaux receveurs. On utilise un pool de cellules issues de 3 donneurs pour reconstituer un groupe de 20 receveurs, en leur transférant les caractéristiques des animaux donneurs spécifiquement dans les cellules sanguines.

Le modèle murin de génération de chimères par transplantation de moelle osseuse permet d'étudier les cellules circulantes et cellules constitutives. Des souris de type sauvage et déficientes pour des gènes de la réponse immunitaire seront utilisées. Les lignées indiquées ne présentent pas de phénotype dommageable, sauf la lignée MOCOS déficiente qui présente une insuffisance rénale pouvant se traduire par une immobilité, isolement, prostration, amaigrissement visible (rachis et os thoraciques devenant apparents). Les souris déficientes pouvant être susceptibles aux pathogènes sont maintenues dans un environnement avec un statut sanitaire de type EOPS (Exempt organismes pathogènes spécifiques). La compréhension de ces mécanismes permettra d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques pour améliorer les traitements de pathologies inflammatoires.

Les cellules du compartiment hématopoïétique, peuvent être éliminées par irradiation corporelle totale. Dans un premier temps une irradiation des animaux receveurs sera réalisée afin d'éliminer les cellules hématopoïétiques.

Puis, une greffe de moelle osseuse est réalisée à partir de la moelle osseuse d'une souris donneuse différente. Cette technique est utilisée chez l'Homme dans le traitement de leucémies. Les cellules de la moelle osseuse d'animaux donneurs seront récupérées post-mortem et injectées par voie intraveineuse aux animaux receveurs (Procédure 1). En parallèle, des souris contrôles seront

irradiées et non reconstituées afin de vérifier l'efficacité de l'irradiation (Procédure 2). Bien que désagréable, l'irradiation ne devrait pas provoquer de douleur forte, comme constaté chez l'homme. Sans reconstitution les animaux ne peuvent pas survivre. Ces animaux seront donc conservés jusqu'à l'application du point limite (Procédure 2).

La prise de la greffe de moelle osseuse peut être suivie à 8-10 semaines après la reconstitution un prélèvement sanguin retro-orbital est effectué sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (2 à 3%) afin de vérifier l'efficacité de la reconstitution par numération des cellules sanguines ou cytométrie en flux afin de vérifier la présence de cellules issues des animaux donneurs.

Comme chez l'Homme, l'irradiation peut entraîner des effets secondaires. Chez la souris le pelage, noir à l'origine, peut devenir gris après plusieurs semaines et on note un amaigrissement, par conséquent une surveillance quotidienne des animaux est réalisée dès leur arrivée. La reconstitution est effective 8-10 semaines après le transfert de moelle osseuse. Par conséquent, avant cela les animaux sont très sensibles aux infections et doivent être manipulés le moins possible. L'amaigrissement sera suivi visuellement (rachis et os thoraciques apparents) et la perte de poids sera mesurée une fois par semaine pour limiter le risque de contamination. Une grille de scoring et des points limites prédictifs sont mis en place et suivis quotidiennement pour détecter une douleur ou souffrance éventuelle. En cas d'amaigrissement, les animaux sont observés deux fois par jour, tout en évitant de les manipuler.

Une fois reconstitué, le système sanguin est normal, comme chez les patients stabilisés après greffe de moelle osseuse, et les animaux peuvent être étudiés pour leur réponse immunitaire. Une fois reconstituées et stabilisées, les souris chimères issues de la Procédure 1 peuvent être étudiées dans des procédures expérimentales ultérieures d'inflammation pulmonaire, d'asthme, d'inflammation cutanée ou intestinale. Ces souris suivront les expérimentations décrites dans les protocoles autorisés au laboratoire.

Le précédent projet « Etude du rôle des compartiments cellulaires hématopoïétiques et non-hématopoïétiques dans la réponse immunitaire » a permis d'étudier 7 lignées dans 10 expériences et ce nouveau projet doit consolider ces résultats et élargir l'étude à de nouveaux aspects de la réponse immunitaire comme la réponse aux acides nucléiques.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours fiable et pertinent permettant d'étudier les mécanismes d'inflammation et de régulation. Ce projet sera réalisé dans un souci de respecter la règle des 3R:

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, 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 : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Ils reçoivent un enrichissement de leur milieu afin de se créer un nid (celluron, papier ou coton). Cela permet de satisfaire leurs instincts naturels, de réduire le stress et d'aider à la thermorégulation. Les animaux sont hébergés par 5 maximum dans des cages de 530 cm<sup>2</sup> à fond plein sur portoir ventilé selon les conditions d'hébergement requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Cet hébergement est suffisant pour garantir leur état sanitaire.

Si des animaux présentent des signes de souffrance atteignant le point limite, ils seront mis à mort. Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs et reproductibles. Pour ce projet il est prévu d'étudier 1560 souris au maximum durant les 5 ans.

**20297** La première cause de mortalité par cancer chez la femme est le cancer du sein, qui est le plus fréquent des cancers féminins au niveau mondial. La survie à 5 ans de ce cancer est fortement impactée par la présence ou non de métastases au moment du diagnostic. Ainsi, en France, la survie à 5 ans est très bonne (> 90%) lorsque le cancer est diagnostiqué au stade de carcinome in situ, alors qu'elle chute dramatiquement (environ 23%) lorsqu'il est identifié à un stade de carcinome infiltrant métastatique. Par conséquent, la forte mortalité associée à ce cancer est liée à l'acquisition

par les cellules cancéreuses de capacités de migration et d'invasivité, leur permettant d'envahir les matrices et tissus environnants avant de s'échapper dans la circulation systémique et d'établir de nouveaux foyers cancéreux. Il n'existe à ce jour, aucun traitement ciblant spécifiquement les propriétés de migration et d'invasivité des cellules cancéreuses ou le développement des métastases.

L'harmine est un alcaloïde naturellement présent dans des plantes aromatiques et médicinales (PAM) telles que *Peganum harmala* L., utilisée en médecine traditionnelle orientale depuis des millénaires, dans de nombreuses indications dont le cancer. La faible solubilité des analogues d'harmine a cependant freiné leur développement. Notre partenaire chimiste médicinal a développé des dérivés du noyau imidazo [1,2-a :4,5-c'] dipyridine qui possède un atome d'azote supplémentaire en jonction de cycle, par rapport au squelette de base de l'harmine. Cette différence est suffisamment ténue pour pouvoir espérer conserver l'activité anti-cancéreuse de l'alcaloïde, et peut en revanche être cruciale pour modifier : 1) les paramètres physico-chimiques (solubilité notamment), la réactivité chimique du noyau et donc les possibilités de fonctionnalisation de ces composés, et 2) les interactions avec les cibles cellulaires et donc la pharmacologie de ces dérivés. Notre partenaire a développé une série de 29 composés dont 8 molécules présentent des activités antiprolifératives et anti-migration ceci sans générer de cytotoxicité sur les cellules saines. Les premiers résultats sont extrêmement encourageants et prouvent la pertinence de ces molécules dans le cadre de la recherche contre le cancer. Ce projet a pour objectif de tester au sein de notre laboratoire les effets anti-cancéreux des 8 molécules les plus actives *in vitro* sur la prolifération et la migration cellulaire qui sont des étapes cruciales dans la progression métastatique des cancers. Pour cela nous utiliserons un modèle syngénique de greffe orthotopique (injection de 10<sup>4</sup> cellules dans le ganglion mammaire) de cellules cancéreuses mammaires murines 4T1-Luc (exprimant le gène de la luciférase de façon stable), chez la souris BALB/cJ afin de suivre au cours du temps la croissance tumorale et le développement métastatique au pied à coulisse et en imagerie de bioluminescence. Les souris seront anesthésiées lors de l'induction tumorale ainsi que pendant les actes d'imagerie du suivi de la prolifération et du développement métastatique.

Dans un premier temps, nous testerons la tolérance des molécules développées chez la souris BALB/cJ saine pour 4 concentrations comprises entre 1 et 30 µg. Puis nous testerons l'efficacité des molécules, injectées en intrapéritonéal ou intraveineux en deux doses (IC<sub>50</sub> et 2 x IC<sub>50</sub>), à réduire la croissance tumorale mammaire et le développement métastatique chez la souris BALB/cJ transplantée avec les cellules 4T1.

Des points limites (taille de ma tumeur mammaire > 2 cm<sup>3</sup>, perte de poids >10%, comportement et locomotion altérés, détérioration du pelage) permettront d'anticiper le cas échéant toute souffrance qui pourrait apparaître au cours de l'expérimentation. Ce projet nécessitera 348 souris.

Les dommages attendus sont liés au développement d'une tumeur mammaire (locomotion altérée, signes comportementaux de gêne) et éventuellement à l'apparition de foyers tumoraux secondaires (métastases). Ce projet qui mettra en œuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R : Raffinement : les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation. Réduction : la mise en œuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données. Remplacement : les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le développement tumoral et l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

**20298** La détermination de la toxicité aiguë d'un futur médicament est une étape impérative dans son développement et de sa commercialisation. En effet il s'agit d'une information réglementaire indispensable dans le dossier adressé aux autorités avant la première administration à l'Homme. Cette information est également utilisée pour la demande d'autorisation de mise sur le marché.

Cette étude de toxicité aiguë permet de déterminer la dose toxique d'une substance et donc en connaissant la dose efficace sur une pathologie d'évaluer le rapport bénéfice/risque pour le patient.

Dans notre projet nous souhaitons déterminer la toxicité aiguë de médicaments selon les recommandations de l'OCDE. Il s'agit d'administrer une première dose de produit à une petite cohorte de rats puis d'ajuster les doses suivantes en fonction des résultats recueillis sur cette première cohorte. Les effets observés dans un groupe déterminent la suite, qui peut être :

-L'arrêt de l'essai

-L'administration de la même dose à 3 animaux supplémentaires

-L'administration de la dose immédiatement inférieure ou supérieure à 3 animaux supplémentaires

Le choix de la dose initiale est fixé lors d'une réunion préparatoire à laquelle sont présents le responsable du projet et au moins un membre de la structure chargée du bien-être animal. Toutes les informations disponibles sur la substance d'essai telles que ses propriétés physicochimiques, les effets biologiques observés dans des essais *in vitro* ou *in vivo* sont utilisées pour le choix de la dose initiale.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R:

-Remplacer : aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet, en effet notre projet nécessite l'utilisation d'un organisme dans son ensemble car nous étudions les réponses physiologiques intégrées.

-Raffiner : Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement afin que les animaux puissent exprimer certains de leurs comportements propres. L'enrichissement du milieu comporte des tunnels en carton pour permettre aux animaux de se cacher et des boules de bois pouvant servir de jeu et de matériel à ronger. Le sponsor nous fournit les informations nécessaires (nature du solvant, pH), si elles sont disponibles nous utiliserons des solvants courants utilisés dans la littérature afin de limiter la souffrance des animaux. De plus afin de les soulager et souffrances pendant les procédures expérimentales nous avons établi une grille de score pour suivre l'état clinique de nos animaux. Les points limites sont définis pour anticiper le plus précocement possible une mort prévisible des animaux afin de nous permettre de les euthanasier dans les plus brefs délais.

-Réduire : Nous nous appuyons sur notre expertise interne et sur les recommandations de l'OCDE afin d'utiliser un nombre minimal d'animaux dans nos études. Le sponsor est mis à contribution pour nous fournir les informations nécessaires aux choix de la dose initiale afin de ne pas reproduire l'expérience inutilement. En l'absence de ces données, la dose initiale recommandée est de 300mg/kg.

Selon les recommandations, le premier groupe expérimental comprend 3 animaux, puis, en fonction des résultats, les groupes suivants sont choisis selon l'arbre de décision proposé dans la recommandation 423 de l'OCDE. Chaque détermination de la toxicité aiguë implique au maximum 24 animaux.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 720 rats est envisagée.

**20299** En 2020, 19.3 millions de cas de cancers ont été diagnostiqués dans le monde et 10 millions de décès sont à déplorer des suites de cette maladie.

Au total, 1 personne sur 5 souffrira d'un cancer dans sa vie. Un homme sur 8 et 1 femme sur 11 en décèdera. A ce jour, le nombre de patients en rémission (en vie 5 ans après le diagnostic) atteint 50,6 millions. (Des données publiées par le Centre international de recherche contre le cancer (CIRC)).

Les cancers les plus fréquemment diagnostiqués sont les cancers du sein qui représentent 11,7% des nouveaux cas rapportés dans la population mondiale en 2020.

Viennent ensuite le cancer du poumon (11,4%), le cancer colorectal (10%), le cancer de la prostate (7,3%) et le cancer de l'estomac (5,6%).

Le cancer va encore gagner du terrain dans les décennies à venir. En 2040, le nombre de nouveaux cas devrait s'élever à 28,4 millions.

En cause, la hausse globale des principaux facteurs de risque : le tabagisme, l'alimentation déséquilibrée, le surpoids et la sédentarité.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux candidats médicaments, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des modèles cellulaires humains reconstruits, mimant artificiellement la pathologie de l'homme. Grâce à ces tests in-vitro, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles in-vivo de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations in-vivo, il est indispensable d'utiliser en premier lieu un modèle tumoral maîtrisé et bien caractérisé qui mime la pathologie humaine par implantation de cellules tumorales ou de fragments tumoraux chez la souris. L'animal porteur de tumeur devient ainsi un modèle expérimental pertinent pour évaluer les composés anti-cancéreux.

Ce projet va ainsi consister à déterminer les conditions optimales de greffe et de croissance de différents types de tumeurs d'intérêt pour l'évaluation et la sélection de candidats médicaments. Son objectif est de disposer de modèles fiables, robustes et reproductibles à mettre en œuvre dans le cadre d'autres projets.

Dans ce projet les souris sont immunocompétentes, c'est-à-dire que leur système immunitaire est parfaitement fonctionnel. En effet, certains traitements anti-cancéreux, comme l'immunothérapie ou la thérapie ciblée, nécessitent parfois le recours au système immunitaire pour être actifs et efficaces. Seules des lignées tumorales murines pourront ainsi être greffées chez les souris (des tumeurs provenant de patients humains seraient immédiatement rejetées par l'organisme d'une souris immunocompétente). Elles sont choisies spécifiquement pour leurs similarités physiologiques et comportementales avec les tumeurs rencontrées chez l'homme.

Une pré-sélection des conditions expérimentales à tester est réalisée avant le démarrage des études par une phase de recherche bibliographique pour chaque nouvelle lignée tumorale à étudier. Sur la base de ces informations, différentes concentrations de cellules tumorales sont injectées en voie sous-cutanée, intradermique ou en intra mammaire à des souris (des fragments tumoraux pourront également être évalués par voie sous cutanée uniquement) et le profil de croissance tumorale est ensuite évalué par mesure de la taille de la tumeur au pied à coulisses au cours du temps.

#### REMPACEMENT :

Afin d'identifier des traitements anti-cancéreux ciblant le système immunitaire ou des thérapies ciblées, il est indispensable que ces études soient réalisées dans un organisme intégré qui regroupe les interactions vasculaires, hormonales, immunitaires et tissulaires importantes dans le développement des cancers. Les expériences mises en œuvre dans le cadre de ce projet sont effectuées pour définir les conditions expérimentales qui permettront de s'approcher au plus des conditions observées chez l'homme. Lorsque le modèle sera complètement caractérisé, il sera ensuite utilisé dans un autre projet pour déterminer l'efficacité de candidats médicaments développés dans le cadre de la recherche d'anticancéreux. De ce fait, les études de ce projet seront réalisées en amont de tout autre projet de caractérisation de candidat médicament.

#### REDUCTION

Ce projet sert à définir, pour chaque nouvelle lignée tumorale à étudier, les conditions optimales de greffe et l'homogénéité de la croissance en préparation de projets d'efficacité de traitement et de pharmacodynamie. Il contribue ainsi à la réduction du nombre d'animaux utilisés dans les futures études en permettant une bonne connaissance des caractéristiques de croissance comme la variabilité et ainsi que le nombre de souris à greffer, ou encore les conditions expérimentales de greffe afin de garantir la réussite de ces études.

Une recherche bibliographique sur le type de tumeur à étudier est systématiquement réalisée en amont afin d'utiliser en première instance la souche murine de laquelle provient la lignée tumorale et de ne centrer la mise au point et l'optimisation de la greffe que sur les conditions expérimentales



(matrigel, nombre de cellules, ...). Dans ce projet des lignées tumorales murines sont choisies pour leurs similarités physiologiques avec les tumeurs humaines

Un accompagnement par le service biostatistique sera réalisé pour définir les conditions optimales de greffes et estimer la variabilité de la croissance tumorale grâce à la modélisation longitudinale de la croissance tumorale en incluant les différentes conditions expérimentales évaluées. Cette étape permettra in fine d'établir le nombre d'animaux nécessaire par groupe pour les études d'efficacité de traitement et de pharmacodynamie.

#### RAFFINEMENT :

Le suivi de la croissance tumorale par pied à coulisse est une méthode non invasive pour l'animal et sans douleur. Elle permet une mesure rapide et régulière au cours du temps chez la souris vigile. Les tumeurs sont mesurées plusieurs fois par semaine, à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour limiter la souffrance et appliquer les points limites si nécessaire.

Les souris sont maintenues en groupes sociaux tout au long de l'étude.

L'habitat des souris est enrichi de matériel pour leur permettre d'exprimer leur instinct de nidification ainsi que pour ronger. Cet enrichissement va également permettre de surveiller leur état général par leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement

Les animaux font l'objet d'une observation clinique tout au long de l'étude, particulièrement dès les 1ers signes de croissance tumorale, assurée en priorité par les expérimentateurs mais également par les zootechniciens.

Compte tenu du nombre de lignées tumorales pouvant être étudiées sur 5 ans, on estime à 3000 le nombre de souris nécessaire pour ce projet.

**20300** Ce projet est en lien avec le concept d'exposome qui prend en compte le fait que, tout au long de sa vie, un individu va être exposé à un ensemble de polluants environnementaux et professionnels qui vont avoir une répercussion sur sa santé. Ces expositions multiples peuvent produire des effets plus prononcés que lorsque l'on considère un polluant séparément.

Notre projet porte sur une coexposition à deux facteurs de stress de natures différentes en lien avec les activités professionnelles liées à l'utilisation de l'énergie nucléaire. Dans ce contexte, le personnel est exposé à des polluants de nature chimique et radiologique représentant un risque pour leur santé. La principale cause de contamination inhérente à ces activités est l'inhalation de polluants sous forme de particules et l'exposition à des rayonnements ionisants. Le cerveau est un organe cible de ces expositions et y est particulièrement sensible.

L'objectif de ce projet est l'étude des effets d'une coexposition de nature chimique et radiologique sur le cerveau de rat par une approche preuve de concept (une approche ayant pour de démontrer qu'un projet innovant puisse avoir une application concrète). Nous proposons d'étudier les effets biologiques induits par l'inhalation de particules de tungstène, présenté comme un contaminant émergent dans la littérature scientifique – valence chimique de notre co-exposition. Cette exposition sera associée à une exposition par irradiation externe à une faible dose de rayonnements ionisants – valence radiologique. Notre modèle expérimental repose sur des expositions *in vivo* uniques à un aérosol de tungstène et/ou une exposition externe à des rayonnements gamma. Ces expositions seront suivies d'analyses des effets à court et moyen terme après l'exposition (24 heures, 7 et 28 jours). Les analyses réalisées permettront d'étudier si l'exposition à ces deux stressseurs induit des effets potentiellement plus prononcés que lorsque les expositions se font séparément. Nous étudierons s'il y a une modification de paramètres biologiques liés à l'inflammation dans le cerveau et si la survie des neurones est altérée. Ces études viendront contribuer à l'accroissement des connaissances sur les effets potentiels de l'exposition à plusieurs polluants sur le cerveau et ainsi permettre à plus long terme la mise en œuvre de nouvelles normes de protection.

La conception de ce protocole répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées et dans le respect de l'éthique animale (suivi des animaux, anesthésie-analgésie adaptées, hébergement en groupe avec enrichissement). Pour

réaliser les expositions par inhalation ou irradiation, les animaux intégrés dans ce projet sont habitués progressivement aux procédures ce qui réduit significativement leur stress.

Afin de mimer une situation d'exposition réaliste à laquelle un homme pourrait être soumis, il apparaît pertinent d'utiliser un modèle *in vivo*. Ceci est particulièrement vrai dans la mesure où l'étude met en jeu des voies de transfert entre différents organes. Il s'agit d'interactions biologiques pour lesquelles il n'existe pas de modèle de culture cellulaire *in vitro* permettant d'étudier ces effets sur le cerveau entier.

L'espèce choisie est le rat car l'anatomie de son système olfactif et de son cerveau est suffisamment proche pour formuler une hypothèse extrapolable à l'homme à partir des résultats obtenus.

Le nombre de rats choisi pour ce protocole est déterminé pour être suffisant pour pouvoir exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique. Les expériences de coexpositions sont réalisées sur 380 rats Sprague-Dawley. Ce nombre est nécessaire afin de mettre en œuvre les différentes techniques d'analyses biologiques par suite des expositions pour évaluer les effets sur l'inflammation cérébrale et la survie des neurones dans le cerveau.

Tout au long des procédures, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux avec des observations régulières et la définition de points-limites spécifiques pouvant entraîner l'euthanasie précoce de l'animal.

**20301** La mise en place des dysfonctionnements neuronaux présents dans la maladie de Parkinson est mal connue. Les besoins de recherche à ce sujet sont forts à la fois d'un point de vue sociétal avec une part grandissante de la population atteinte par cette pathologie, mais également économique avec les coûts élevés de développement des médicaments. L'identification d'une nouvelle cible ou d'un procédé permettant d'intervenir plus précocement au cours du développement de la pathologie permettrait de réduire la durée de développement ultérieur ainsi que les coûts associés.

L'étude des signaux électroencéphalographiques a déjà permis de mettre en évidence des différences significatives entre les signaux issus de patients sains et pathologiques. C'est notamment le cas dans l'épilepsie où la combinaison de ces signaux à la stimulation électrique permet de localiser les aires cérébrales à l'origine des crises.

Dans une approche translationnelle, ce projet entend transférer cette méthodologie de stimulation et d'enregistrement en simultané du patient à la phase préclinique. Une telle approche permettra d'orienter de futures recherches de nouvelles thérapies pour lutter contre ces pathologies. Pour obtenir les autorisations de mises sur le marché, les entreprises pharmaceutiques doivent prouver l'efficacité et l'innocuité de leurs nouvelles molécules. C'est pour apporter des données quantifiables, fiables et rapides aux industriels que nous proposons cette nouvelle méthodologie pour développer de nouvelles molécules antiparkinsoniennes.

Pour cela, nous étudierons la modification des oscillations cérébrales sous l'action d'une stimulation électrique. Il s'agit d'utiliser des électrodes intracérébrales afin de stimuler et d'enregistrer de manière simultanée ces modifications dans différentes aires cérébrales. Nous nous intéresserons ici au cerveau des rats (*Rattus norvegicus*) ayant de fortes similarités avec le cerveau humain. Nous appliquerons cette approche dans des modèles de rats sains et des modèles de la maladie de Parkinson. Cette étude pourrait apporter des informations sur le fonctionnement normal et pathologique de ces réseaux encore mal connus. Les potentielles différences mises en évidence et le pouvoir translationnel des biomarqueurs électroencéphalographiques permettra d'aider à développer efficacement de nouvelles molécules ayant un potentiel thérapeutique.

Pour ce projet, nous allons utiliser 752 rats sur 5 ans, répartis dans des lots de 16 à 40 rats selon les procédures suivies.

Réduction : Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées. De plus, les animaux sont traités en plan d'étude croisé. Chaque animal possède quatre 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 électroencéphalographique chez le rongeur avec une chirurgie de classe modérée. 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 via l'utilisation de buprénorphine et/ou de lidocaïne.

**Remplacement :** Ce projet a pour but d'évaluer l'excitabilité cérébrale 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.

## 20302 CONTEXTE

Le cancer est une pathologie provenant du dérèglement des cellules dans un tissu de l'organisme conduisant à une division excessive et anarchique de celles-ci. Cela aboutit à la formation d'une tumeur. Cette dernière acquiert des caractéristiques lui permettant de migrer vers d'autres organes pour former des métastases. Ces métastases participent à l'agressivité des cancers. Les cellules cancéreuses pancréatiques acquièrent rapidement la capacité de migrer vers d'autres organes. Un des facteurs participant à la mise en place de cette migration est une molécule : TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor Beta). Cette molécule, présente de manière physiologique dans notre corps, possède un rôle ambivalent dans le développement des cancers. En effet, dans les stades précoces de la maladie, elle possède des fonctions plutôt anti-tumorales, alors que dans les stades avancés (ou métastatiques), elle participe au développement des tumeurs. Dans ce projet, nous étudions le rôle de deux protéines participant au signal du TGF- $\beta$ . Nous avons émis l'hypothèse que ces deux protéines étaient impliquées dans la progression tumorale, et plus particulièrement dans la migration des cellules cancéreuses pancréatiques, en l'absence d'une autre protéine.

### OBJECTIF

Au niveau cellulaire, nous avons montré que ces deux protéines étaient impliquées dans la mise en place des processus de migration et d'invasion tumorale. Il est maintenant important de confirmer ces effets pro-tumoraux en utilisant un modèle animal intégré et complexe.

### TYPE DE PROJET/PROCEDURES/ESPECE ANIMALE/SORT DE L'ANIMAL

Ce projet de recherche fondamental permettra de confirmer nos observations *in-vitro*, à savoir, l'implication de deux protéines dans l'agressivité des cancers. En effet, l'utilisation du modèle des embryons de poulet permettra de confirmer l'agressivité liée à ces deux protéines, en comparant la prise tumorale, l'invasion locale et les éventuelles métastases. Pour cela, nous allons utiliser des œufs de poules domestiques dans lequel nous allons greffer, les cellules cancéreuses pancréatiques humaines au niveau de la membrane entourant l'embryon de poulet (à J+10 post fécondation). Pour cela, une ouverture sera créée dans la coquille d'œuf, permettant un accès facile à l'embryon pour effectuer la greffe de cellules. Cette ouverture sera refermée instantanément suite à la greffe à l'aide de ruban adhésif transparent permettant l'observation de l'embryon sans en perturber son développement. La durée de l'expérience sera de 15 jours et à la fin de l'expérience, les animaux seront mis à mort. Nous utiliserons au maximum 200 œufs fécondés de poules ce qui nous permet de constituer deux groupes avec suffisamment d'individus (100 par groupe) afin de répondre à l'objectif fixé. Des pertes pourront être constatées lors de l'expérience. Premièrement, tous les œufs reçus ne seront pas fécondés. De plus, des œufs pourraient être cassés lors du transport et lors de l'expérience. Enfin, le risque de contamination par levures et/ou champignons est également élevé. L'ensemble de ces œufs sera donc exclu de l'expérience, réduisant d'au moins 50% le nombre d'œufs par groupe (soit environ 50 individus par groupe). A l'issue de ce projet, si nous validons les observations obtenues au niveau cellulaire, à savoir, l'implication de deux protéines dans la mise en place de la prise tumorale et de la migration des cellules cancéreuses, nous pourrions développer d'autres études pour cibler les effets pro-tumoraux de ces deux protéines.

### CONFORMITE AVEC LES 3R :

Réduction

Le nombre d'animaux a été réduit par les tests *in-vitro* réalisés en amont. De plus, nous utiliserons la quantité minimale d'animaux pour avoir des résultats interprétables et significatifs.

#### Raffinement

Tout acte qui sera effectué sur l'embryon aura été pensé dans le souci du respect du bien-être. Un suivi adapté des animaux et une définition des points limites précoces et prédictifs d'un mal être, permet de limiter au maximum la souffrance animale.

#### Remplacement

Ce projet fait suite à des études préalablement menées *in vitro*, sur des cellules en culture mais il est nécessaire de valider nos résultats dans un système intégré complexe pour valider nos hypothèses.

**20303** Dans les administrations traditionnelles de médicaments telle que l'ingestion, le médicament est distribué dans tout le corps de façon non ciblée via la circulation sanguine. Ainsi, une grande proportion de la dose de médicament administrée n'atteint pas sa cible. Ce médicament n'est pas seulement « perdu » pour le traitement, il est souvent également nocif pour le patient, provoquant des effets secondaires potentiellement graves.

L'objectif de notre étude est de développer des produits pharmaceutiques innovants, capables de contrôler la distribution des médicaments afin d'atteindre le colon, organe cible dans le traitement des maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) que nous étudions.

Ainsi, au cours de notre projet, nous testerons 1/ la capacité de nos nouvelles formulations à libérer le principe actif de manière contrôlée au niveau du colon à l'aide d'un colorant inerte et 2/ l'efficacité de principes actifs ainsi formulés en comparaison aux principes actifs non formulés dans un modèle induit de colite mimant les MICI.

« Remplacer » : le processus d'induction d'une colite faisant notamment intervenir la flore intestinale, le système immunitaire muqueux et systémique, ne peut pas être modélisé. L'utilisation d'un modèle animal est donc indispensable. Cependant, des tests *in vitro* utilisant des simulateurs des différents compartiments gastrointestinaux sont réalisés en amont afin de sélectionner les candidats les plus pertinents à tester sur animaux permettant de « réduire » au maximum le nombre d'animaux utilisés en expérimentation. « Raffiner » : Les animaux seront suivis quotidiennement, par du personnel formé, pour pouvoir identifier les signes de souffrance tels que la prostration, l'agressivité ou le poids corporel dont une perte de plus de 15% sera définie comme point limite.

Nous envisageons de tester une dizaine de formulations différentes sur la durée du projet (5 ans). Dans cette étude, nous utiliserons des rats Sprague Dawley. Ainsi un maximum de 1950 rats sera nécessaire.

**20304** Le lymphome folliculaire (LF) est un cancer des cellules immunitaires de type lymphocytes B. Il se développe au sein des ganglions lymphatiques mais aussi, dans près de 70% des cas, au niveau de la moelle osseuse. Cette pathologie, malgré des avancées thérapeutiques notables, reste à l'heure actuelle incurable et sa fréquence est en constante augmentation dans les pays industrialisés. Les cellules tumorales de LF se caractérisent par l'accumulation d'altérations génétiques que les progrès récents du séquençage ont permis de préciser. Ces multiples anomalies permettent de favoriser la croissance tumorale et la résistance au traitement non seulement en agissant directement sur la survie, la prolifération ou la différenciation des cellules tumorales mais aussi en favorisant le dialogue des cellules de LF avec les cellules qui l'entourent, aussi appelées cellules du microenvironnement ou niche tumorale. Ainsi des sous-types particuliers de cellules stromales, de macrophages et les lymphocytes T CD4+ participent à la croissance tumorale. En particulier, les cellules stromales soutiennent directement la survie des cellules B tumorales et sont impliquées dans l'organisation de la niche pro-tumorale en recrutant et activant les autres cellules du microenvironnement. Cependant, l'absence de modèles *in vitro* et *in vivo* pertinents a limité,

jusqu'à aujourd'hui, l'étude fine des interactions entre les cellules du microenvironnement et les lymphocytes B tumoraux dans ses dimensions spatiales, cinétiques et moléculaires.

Parmi les modèles murins actuels mimant la translocation de Bcl2 au locus IgH (premier évènement oncogénique lors du LF), aucun ne reproduit fidèlement le développement du lymphome folliculaire. Notre objectif est d'étudier l'impact de mutations additionnelles sur la lymphomogénèse pour tenter de créer un modèle s'approchant au plus près de la pathologie humaine.

Ce projet a déjà fait l'objet d'un projet APAFIS et a été validé par le ministère de la recherche et de l'enseignement. Ces trois dernières années, nous avons caractérisé le développement cellulaire B au sein des organes lymphoïdes primaires (moelle osseuse) et secondaires (rate et ganglions) des deux lignées de souris surexprimant Bcl2 présentes au sein de l'animalerie: les souris 3'RR-Bcl2 (Bcl2 placé sous le contrôle de l'enhancer distal du locus des chaînes lourdes d'immunoglobulines) et IgK-KI-Bcl2 (Bcl2 placé sous le contrôle des éléments régulateurs du locus Ig Kappa). Ces résultats nous ont permis de choisir le modèle surexprimant Bcl2 le plus adéquat pour l'étude du LF. Ainsi, nous avons croisé les souris 3'RR-Bcl2 avec des souris porteuses d'altérations: (1) affectant les lymphocytes B et fréquemment présentes chez les patients atteints de FL (HVEM et KMT2D) et (2) entraînant l'exacerbation des réactions immunes favorisant la transformation des cellules malignes (Roquin).

Le développement d'une pathologie approchant le LF a été observé chez un petit nombre d'animaux après 18 mois de suivi. La caractérisation de ces animaux est à ce jour incomplète. Nous envisageons l'étude d'animaux plus jeunes afin de caractériser le stade précoce et intermédiaire du développement de la maladie. L'étude d'animaux âgés sera également nécessaire afin de confirmer ce que nous avons observé. Nous analyserons le développement lymphocytaire B et la fonctionnalité de ces cellules (prolifération, apoptose, répertoire antigénique, capacité de réponse à une immunisation...), ainsi que la composition et la fonctionnalité du micro-environnement, tout en surveillant l'occurrence éventuelle de lymphoproliférations.

Le travail est effectué au sein du laboratoire tout en respectant la règle des 3R, à savoir :

-Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse immunitaire d'un organisme lors du développement d'une pathologie. Le système immunitaire murin est proche de celui de l'homme et les modèles murins sont bien décrits comme permettant de mimer le phénomène observé chez l'Homme.

-Réduire : le nombre d'animaux utilisés lors de ce projet sera le nombre minimal requis pour assurer la reproductibilité et la puissance statistique des résultats.

-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. La personne en charge des injections et des prélèvements est une personne qualifiée de par son expérience et les différentes formations obtenues: formation à l'expérimentation animale et formation chirurgie.

Sur 3 ans, nous projetons d'utiliser 810 animaux pour le maintien de lignées, animaux nécessaires à la génération des animaux d'intérêt. Nous planifions de suivre 30 animaux par lignées d'intérêt pour la caractérisation des stades stade précoce, intermédiaire et tardif de la maladie soit 120 animaux. Nous prévoyons également certaines expérimentations complémentaires suite à la révision du papier en cours de rédaction pour 3 lignées incluant 10 animaux par lignées soit 30 animaux.

Soit un total de 960 animaux sur 3 ans.

**20305** L'acné inflammatoire chez l'Homme est une maladie multifactorielle du follicule pilosébacé, dont l'une des causes est une bactérie. A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre l'acné cependant ils sont tous associés à des effets secondaires plus ou moins importants (irritation, résistance aux antibiotiques, molécules tératogènes).

A ce jour, très peu de nouvelles molécules ont été mises sur le marché et la demande reste importante pour de nouvelles molécules efficaces avec peu d'effets secondaires.

Notre travail s'inscrit dans l'étude de la physiopathologie de l'acné et plus particulièrement la compréhension des mécanismes moléculaires intervenant dans l'acné inflammatoire.

Une des protéines caractérisant la bactérie possède une action pro-inflammatoire *in vitro* et *ex vivo*. La protéine, produite par l'intermédiaire d'une autre bactérie, est également pro-inflammatoire *in vitro* et *ex vivo*.

A partir de cette protéine, une production d'anticorps a été réalisée ainsi que la synthèse de molécules inhibitrices d'intérêt. Ces deux types de composés sont capables de diminuer la réaction inflammatoire *in vitro* et *ex vivo*.

Le but de ce projet est de confirmer l'action pro-inflammatoire de la protéine

Dans un modèle d'inflammation murin induit par la bactérie dans l'oreille et d'évaluer la pertinence des molécules inhibitrices. La validation *in vivo* et *ex vivo* des anticorps et de molécules inhibitrices d'intérêt pourra permettre d'avoir un rationnel pour les utiliser comme molécules anti-inflammatoire dans l'acné et ainsi envisager leur test chez l'Homme.

En pratique, il faudra réaliser des injections intra-dermique de bactérie ou protéine (X) avec ou non un inhibiteur (anticorps/molécule inhibitrice) sous anesthésie gazeuse. Les inhibiteurs seront testés sous une seconde forme, un gel qu'il faudra appliquer directement à la suite de l'injection.

Durant 4 jours suivant le traitement, le score inflammatoire sera comparé avec les groupes contrôles. Ce score est établi en faisant la somme des différents événements (l'épaisseur, la rougeur et la présence de desquamations/pustules) observés sur les 2 oreilles d'une souris. Une surveillance des animaux sera mise en place avec des points limites associées à une prise en charge de la douleur si nécessaire.

A J4, différents échantillons seront prélevés sur les animaux (oreilles, sang, rate, ganglions) pour analyser la réponse inflammatoire.

Ce projet est une étude pilote qui impliquera l'utilisation d'un total de 150 souris pour une durée maximale de 2 ans. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. Ce projet sera mené en respectant la règle des 3R.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs immuns mis en jeu dans la pathologie cutanée : acné. Des études *in vitro* ont montré le rôle inflammatoire de la protéine X dans l'inflammation ainsi que la capacité de réduire l'inflammation des anticorps et des molécules inhibitrices. Il n'est cependant pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu, en particulier les cellules de l'immunité responsables de la réponse inflammatoire.

Réduction : Des études statistiques a priori et a posteriori sont réalisées pour éviter l'utilisation injustifiée d'animaux et avoir des résultats fiables. Une veille bibliographique régulière est également effectuée afin d'éviter de reproduire des données déjà publiées.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats, dans le respect du bien-être animal et en limitant sa douleur et son 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. Des points limites spécifiques ont été déterminés afin d'arrêter l'expérience si nécessaire.

Les résultats de ces travaux devraient permettre de proposer de nouvelles approches thérapeutiques pour l'acné inflammatoire chez l'homme.

**20306** Le développement de troubles neurocognitifs complique fréquemment les radiothérapies cérébrales, notamment chez l'enfant. La protonthérapie permet de minimiser l'irradiation des tissus sains entourant les tumeurs. La protonthérapie représente ainsi une avancée significative pour le traitement des tumeurs pédiatriques. Elle n'en reste pas moins responsable d'effets neurocognitifs (déficit de concentration, d'attention, mémorisation à l'origine de difficultés scolaires et d'insertion) et, au final, si l'épargne cérébrale liée à la distribution de dose en profondeur des protons est évidente, la comparaison des toxicités cérébrales pour une même dose reçue (en radiothérapie conventionnelle versus protonthérapie) reste à analyser.

Le but de ce projet est de comparer les effets induits par une irradiation cérébrale conventionnelle versus par protonthérapie chez des souris âgées de 21 jours pour modéliser l'irradiation de patients adolescents.

Les conséquences cognitives et comportementales des irradiations seront évaluées à l'aide d'une batterie de tests biologiques et comportementaux.

En contribuant à mieux connaître les effets neurotoxiques de la protonthérapie et ses avantages par rapport à la radiothérapie conventionnelle, notre projet devrait permettre le développement de nouvelles stratégies préventives et/ou thérapeutiques limitant les atteintes neurocognitives.

Ce projet va nécessiter l'utilisation de, au maximum, 330 souris.

Notre projet a été élaboré en conformité avec la règle des 3R

Remplacer :

Le but de cette étude est de caractériser des effets neurocognitifs. Il est donc nécessaire de travailler avec un modèle vivant intégré et autonome.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement :

Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé en continu, avec un enrichissement adapté à leur espèce. Une période minimale de 7 jours sera respectée entre l'arrivée des souris et l'application des procédures expérimentales pour leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement et ainsi limiter leur stress.

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.

**20307** 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 directement dans les cellules du cerveau. Cette accumulation de cholestérol a également été montrée dans la maladie d'Alzheimer. Ce cholestérol, peut également s'accumuler dans les parois des vaisseaux sanguins qui irriguent le cerveau, formant des lésions d'athérosclérose qui empêchent une bonne oxygénation des neurones et aboutit à une altération du fonctionnement cognitif : la démence vasculaire.

L'objectif de ce projet est l'identification des mécanismes par lesquels deux protéines spécifiques régulent le taux de cholestérol dans la cellule. Nous étudierons comment ces protéines sont impliquées dans l'apparition de la démence vasculaire et les maladies neurodégénératives. Ce projet sera réalisé sur plusieurs sites et pour chaque site, une demande d'autorisation avec les procédures expérimentales spécifiques seront déposées. Nous utiliserons des souris génétiquement modifiées pour l'expression d'une de ces protéines. Nous donnerons un régime riche en cholestérol à ces souris et nous les soumettrons à des tests comportementaux. Nous étudierons l'évolution au cours du temps de la connectivité entre différentes régions cérébrales à la fois fonctionnelle et

structurelle, de ces souris génétiquement modifiées, via une approche en Imagerie par Résonance Magnétique (IRM). Les données d'imagerie seront ensuite corrélées à des investigations histopathologiques et les résultats des tests de comportements. Ce projet nous permettra d'étudier l'influence de ces protéines sur l'installation de la démence vasculaire et les maladies neurodégénératives. Si les premiers résultats montrent une implication d'une de ces protéines dans ces pathologies, nous utiliserons des anticorps bloquant l'une ou l'autre de ces protéines ou un agent anti-cholestérolémiant reconnu, afin d'améliorer la cognition des souris.

Avec ces modèles animaux nous pourrions étudier les mécanismes contrôlant l'accumulation du cholestérol dans les vaisseaux cérébraux et les cellules nerveuses et développer une thérapie pour limiter cette accumulation.

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 et les troubles cognitifs. En effet ces atteintes sont multifactorielles et nécessitent un grand nombre d'acteurs comme les cellules de l'immunité, les particules de cholestérol circulantes (les LDL ou mauvais cholestérol), les globules rouges entre autre. 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) et cellules musculaires lisses (lignée cellulaire) pour approfondir les résultats obtenus sur les animaux et étudier certains mécanismes liés à l'utilisation du cholestérol par ces types de cellules.

Réduction : Si nous arrivons à mettre en évidence un mécanisme d'action rapidement, nous n'utiliserons pas le nombre total d'animaux demandé (380 animaux sur 5 ans au total).

Nous utiliserons également nos souris afin de faire des cultures de cellules cérébrales et cellules musculaires lisses, dans le but d'identifier les mécanismes cellulaires qui protègent de l'accumulation du cholestérol. La partie « culture de cellules » permettra de limiter le nombre d'animaux nécessaire à notre étude.

Raffiner : Nous mettrons en place différents points limites dans notre expérimentation pour atténuer la gêne de nos animaux liée au régime riche en cholestérol que nous leur donnerons : ces points limites sont définis en tenant compte de l'aspect et du comportement des animaux au cours du régime. Pendant la phase de régime, les animaux seront 3 à 5 dans des cages, avec des enrichissements sous forme de morceaux de bois pour que les animaux usent leurs dents et un carré de coton qu'ils pourront utiliser pour confectionner leur nid. Le suivi de l'état des animaux sera quotidien.

**20308** Ces dernières années ont fortement contribué à mettre en évidence le rôle clé du microenvironnement tumoral (toutes les cellules non tumorales qui entourent et interagissent avec la tumeur) dans le développement de la tumeur, son expansion métastatique et la réponse aux traitements. Une stratégie antitumorale en développement est l'utilisation de médicaments anticancéreux qui agissent en inhibant les voies de réparation de l'ADN. Ces drogues agissent en synergie avec la radiothérapie et la plupart des chimiothérapies. Elles ont été testées en association avec la radiothérapie dans un essai clinique de phase I/II sur des malades présentant une métastase locale de mélanome cutané.

L'étude proposée vise à analyser les modifications du microenvironnement durant les traitements, préparer des essais cliniques en association à la chimiothérapie et la radiothérapie en définissant les meilleures combinaisons et les protocoles d'administration. Les modèles tumoraux testés seront les tumeurs du poumon et les tumeurs du cerveau.

Des cellules cancéreuses humaines sont greffées selon la localisation primaire de la tumeur ou de la métastase sur des souris adultes sous anesthésie. Les traitements associés, tels que les chimiothérapies ou la radiothérapie, sont administrés suivant le protocole le plus en usage.

Pour l'ensemble des expériences prévues, le nombre de souris utilisées est estimé à 4650 souris sur une durée de 5 ans.



Nous effectuerons des mesures régulières sur de nombreux paramètres : mesure du volume de la tumeur par des méthodes non invasives tel que l'imagerie par IRM ou par l'analyse des marqueurs circulants dans certains modèles, formule sanguine, pesée de l'animal, comportement de l'animal. Ces mesures permettront l'évaluation de l'efficacité du traitement sur la tumeur ainsi que d'éventuels effets indésirables des traitements. Ainsi ce suivi régulier sur un même animal de la progression tumorale par différents paramètres nous permettra d'une part d'augmenter la quantité et la qualité des données récoltées et d'avoir recours à des analyses statistiques plus puissantes réduisant le nombre d'animaux utilisés (Réduire).

Comme le micro environnement tumoral est un système complexe aux paramètres extrêmement nombreux et dont la plupart sont inconnus il nous est impossible de recréer cet environnement ex vivo. C'est pour cela que nous devons avoir recours à des études sur l'animal dans lequel tous les paramètres sont présents. Cependant avant l'expérimentation sur animal, les drogues sont testées sur des cultures de cellules de même type tumoral afin d'évaluer au préalable leur potentielle efficacité sur ce type de cancer et ainsi diminuer le nombre d'animaux utilisés. (Remplacement)

En accord avec les recommandations internationales, en particulier dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis individuellement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont stoppées avant la souffrance de l'animal.

**20309** La combinaison de molécules anti-rétrovirales (cART) est très efficace pour inhiber la réplication du VIH. Toutefois, elle ne permet pas d'éliminer le virus qui persiste dans des réservoirs cellulaires et anatomiques. Les singes d'Afrique sont des porteurs naturels du virus de l'immunodéficience simienne (SIV), qui peut induire un SIDA chez les singes d'Asie (macaques). Or, l'infection par SIV chez le singe vert d'Afrique est généralement asymptomatique en dépit de charges virales sanguines et intestinales élevées. Nous avons découvert chez le singe vert une capacité des cellules tueuses naturelles (« natural killer », NK), cellules du système immunitaire, à éliminer les cellules infectées par le SIV dans les ganglions lymphatiques. Nous avons pu démontrer que ces cellules NK sont éduquées via l'interaction d'un de leurs récepteurs de surface avec le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (antigène E), système de reconnaissance du soi chez la plupart des vertébrés. Toutefois de nombreuses questions restent en suspens : Comment une infection virale impacte la maturation et l'éducation des cellules NK ? Pourquoi cette éducation n'a-t-elle pas lieu chez l'homme porteur du VIH ?

Un des obstacles majeurs pour la compréhension de la maturation des cellules NK est que celle-ci se fait rapidement suite à une infection et semble être différente en fonction des tissus, rendant difficile son étude chez l'humain. A ce jour, plusieurs paramètres, comme la contribution relative des différents organes lymphoïdes (moelle osseuse, ganglions et peut-être foie) à la maturation des cellules NK, restent mal connus. Notre objectif est de caractériser la dynamique de certaines cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour comprendre dans quels tissus les cellules NK matures sont générées. Dans un deuxième temps, nous souhaitons évaluer comment le microenvironnement tissulaire (ensemble des cellules et molécules et leurs interactions au sein d'un tissu) influence la génération de cellules NK spécifiques du virus. Il se pourrait que chez l'hôte naturel où l'inflammation est rapidement contrôlée, une production de CSH par la moelle osseuse ait lieu rapidement et massivement après l'infection alors que celle-ci serait moindre dans l'infection SIV pathogène où l'inflammation persiste chroniquement. Les analyses se feront entre autres par séquençage des transcrits exprimés dans les cellules NK (RNA-seq).

Ces données pourraient sur le long terme faciliter l'identification de facteurs associés à la génération de cellules NK encore plus efficaces pour l'élimination de cellules infectées par le VIH et contribuer à la mise au point de nouveaux protocoles thérapeutiques en vue d'une rémission du VIH.

Le projet prévoit le recours à un maximum de 15 singes verts (*Chlorocebus sabaeus*) et 5 macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*), provenant d'élevages agréés. L'utilisation de ces modèles 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 respectifs. 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.

**20310** Toute personne utilisant des animaux à des fins scientifiques doit acquérir les compétences nécessaires à la réalisation de ses projets de recherche impliquant des animaux, conformément à la Directive Européenne 2010/63/EU (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). Pour acquérir ces compétences, les expérimentateurs suivent des formations pratiques sous la supervision d'un tuteur qualifié et expérimenté. Notre installation propose des formations pratiques pour différentes manipulations techniques : injections (intrapéritonéale, sous cutanée, intramusculaire), gavage ou prélèvements (sub mandibulaire, rétro orbitaire, veine caudale). Les expérimentateurs sont d'abord formés à ces gestes sur des animaux en silicone avant de les réaliser sur des animaux vivants. L'utilisation d'animaux vivants est nécessaire pour que la formation soit efficace, notamment pour apprendre à maîtriser la contention associée au geste technique.

Ces formations seront réalisées sur des souris « de réforme » : il s'agit d'animaux nés et élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés, qui n'ont pas été utilisés pour des expériences et doivent être euthanasiés. Un maximum de 100 animaux sera utilisé sur une période de 5 ans, soit environ 20 par an. Ce nombre sera réduit au minimum nécessaire en fonction du nombre de formations à mener. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe sociaux dans un milieu enrichi avec maison pour souris et du matériel de nidification.

**20311** Les troubles psychotiques, incluant la schizophrénie, sont fréquents. Ils apparaissent généralement à l'adolescence, une période de grands changements, tant sur le plan physiologique, psychologique, que social. Ces troubles ont des conséquences majeures sur la vie personnelle, sociale, et professionnelle des patients et de leur entourage en font un véritable enjeu médical et socioéconomique.

Malheureusement l'étiologie de la maladie reste mal connue car plurifactorielle. Son développement résulterait d'une interaction entre gènes et environnement, suggérant qu'il existe une vulnérabilité génétique précipitée par des facteurs environnementaux comme le stress psychosocial. Des adolescents ou jeunes adultes présentant des symptômes atténués ou très transitoires de psychose ont été identifiés comme des individus à ultra-haut risque (UHR) de psychose. Deux tiers des sujets UHR ne développeront pas de trouble psychotique et les thérapies cognitivo-comportementales (TCC) pourraient favoriser cette résilience au stress.

Ce projet, chez le Rat, vise à modéliser la transition psychotique afin d'identifier les mécanismes biologiques impliqués dans cette dernière et la résilience au stress. Aussi, dans un premier temps nous sélectionnerons un stress chronique qui, soumis à l'adolescence, sera capable d'induire chez environ 1/3 des animaux testés des anomalies comportementales s'apparentant à la psychose en utilisant un panel de tests adaptés pour tester l'activité motrice, l'anxiété, la cognition, les comportements sociaux et le filtrage de l'information. Une fois ce stress choisi, nous identifierons les gènes et voies de signalisation impliqués dans ce phénomène chez des animaux subissant un

stress chronique pendant l'adolescence, exposés ou non à un environnement enrichi (modèle des TCC).

La mise en œuvre de ce projet nécessitera l'utilisation de 240 animaux pour une durée de 3 ans. Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures de stress durant l'adolescence, des évaluations comportementales et une exposition à un environnement enrichi. Remplacer : L'utilisation d'un modèle animal est une nécessité car cette étude qui nécessite une approche comportementale n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite *in vitro* ni *ex vivo*. Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats grâce aux données collectées au cours d'expériences précédentes. De plus, certaines expériences présenteront un aspect longitudinal afin de minimiser le nombre d'animaux à utiliser. Raffinement : Pour éviter toute souffrance, les animaux seront observés régulièrement et une grille précise d'évaluation des points limites sera utilisée. Tout signe de douleur sera soulagé avec des analgésiques.

A terme, l'identification des mécanismes biologiques sous-tendant l'effet des TCC pourrait ouvrir la voie au développement de stratégies thérapeutiques innovantes ciblant les stades précoces des troubles psychotiques.

**20312** L'hématopoïèse désigne le processus de formation des cellules sanguines. Toutes les cellules sanguines sont issues d'un type cellulaire unique, la cellule souche hématopoïétique. Des étapes successives de multiplication et de développement de ces cellules souches permettent d'obtenir les cellules sanguines telles que les globules rouges (essentiels au transport de l'oxygène), les globules blancs (essentiels au système immunitaire) et les plaquettes (permettant la coagulation). Ces étapes ont lieu dans différents sites ou organes qui diffèrent suivant le stade de développement. De nombreuses maladies sont liées à un défaut ou à un excès (leucémie, lymphome) de production de ces cellules sanguines. La compréhension des mécanismes de l'hématopoïèse est donc cruciale afin de pouvoir développer des traitements pour ces maladies, mais aussi dans l'objectif de produire des cellules sanguines *in vitro*, d'améliorer l'efficacité des greffes de moelle osseuse ou de cellules souches. Nous avons observé dans une étude précédente que la protéine BMP10 était essentielle à l'hématopoïèse. Notre objectif est de comprendre comment et via quels mécanismes BMP10 régule l'hématopoïèse.

Le recours au modèle animal est nécessaire car l'étude de ces processus est complexe et engage différents acteurs (différents organes, différents types de cellules, facteurs de croissance, la circulation sanguine, la dynamique de croissance etc...) qui ne peuvent pas être entièrement remplacés par des tests *in vitro* ou par une étude *in silico*. Le modèle murin choisi pour réaliser cette étude est un modèle murin transgénique n'exprimant pas la protéine BMP10.

Nous étudierons les effets de la délétion de BMP10 sur l'hématopoïèse, sur la moelle osseuse, la rate et le thymus, et notamment sur les vaisseaux sanguins au sein de ces organes. Nous recherchons quel type de cellule est affecté, pourquoi il est affecté, quels sont les mécanismes. Nous procéderons pour cela à des prélèvements sanguins et à l'analyse des tissus.

Les animaux (souris) sont nés et élevés dans un établissement agréé. Leur nombre (104) 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. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. 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.

**20313** Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de mortalité dans le monde. Elles comprennent notamment les maladies coronariennes (infarctus du myocarde) et les accidents vasculaires cérébraux (AVC). Elles sont très souvent associées à d'autres pathologies sous-

jacentes telles que l'hypertension ou le diabète. Un des principaux traitements consiste en la pose de petits ressorts, appelés "stents", permettant la ré-ouverture d'une artère bouchée ayant causé un infarctus du myocarde ou un AVC. Malheureusement, si ces traitements sont extrêmement efficaces sur le moment, il existe des complications majeures à plus long terme appelées "resténose intra-stent" en particulier chez les patients diabétiques ou hypertendus. La resténose fait intervenir des mécanismes inflammatoires conduisant à une prolifération et migration des cellules musculaires de la paroi vasculaire entraînant une nouvelle obstruction de l'artère et possiblement une récurrence d'infarctus ou d'AVC. Dans ce contexte physiopathologique, notre équipe développe des modèles murins permettant d'étudier ces processus.

Ainsi ce projet a pour objectif d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans les maladies cardiovasculaires et particulier dans la prévention de l'apparition de la resténose suite à la pose de « stent ».

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R :

**Remplacement** : Lorsque cela sera possible, nous réaliserons des cultures de lignées de cellules musculaires lisses vasculaires pour appréhender certains éléments moléculaires. Cependant ces approches de culture cellulaire ne permettent pas d'étudier le remodelage artériel en condition diabétique après angioplastie et n'interviennent qu'en complément de l'utilisation des animaux à des fins scientifiques.

**Réduction** : Le nombre d'animaux par groupe est réduit à son maximum en respectant les contraintes de publication, sans compromettre les objectifs du projet et pour permettre de bonnes analyses statistiques (test 1-way-ANOVA suivi d'un test de Bonferroni lorsque plusieurs groupes seront comparés). Le nombre de souris utilisé est calculé de manière à donner des résultats statistiquement significatifs et est donc précisé dans chaque procédure en fonction de la variabilité obtenue des protocoles expérimentaux mis en jeu.

**Raffinement** : Quelle que soit la procédure utilisée, une observation des animaux en expérimentation est réalisée quotidiennement. L'état général de l'animal est évalué : prise de nourriture, toilette et mouvements habituels sont considérés comme des signes de bonne santé. La douleur est évaluée par les signes de prostration, de perte d'appétit ou de poids et de mouvements pénibles. L'environnement des animaux est enrichi pour éviter l'angoisse. Si un animal présente un amaigrissement associé à une prostration ou un comportement anormal, il est sorti du protocole et sacrifié. Au total, un maximum de 2800 souris devraient être utilisées pour ce programme de recherche.

**20314** Les approches immunothérapeutiques ont permis l'amélioration du traitement de cancers et constituent un domaine de recherche en plein essor. Parmi ces immunothérapies, celles basées sur des anticorps ont vocation à réactiver des lymphocytes T préalablement induits contre la tumeur et non actifs. Ces immunothérapies ne fonctionnent cependant que pour 10 à 40% des patients ce qui limite leur portée. Nous avons récemment développé et breveté une technologie immunomodulatrice qui pourrait permettre d'en améliorer leur efficacité ou d'en produire de nouvelles. Notre technologie permet le ciblage amélioré de récepteurs de cellules tumorales ou de cellules présentatrices de l'antigène. L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité de ces nouvelles immunothérapies pour le traitement des cancers.

Pour évaluer l'efficacité anti-tumorale les techniques de culture cellulaires réalisées *in vitro* ne sont pas adaptées car les mécanismes de défense immunitaire et de progression tumorale sont le fruit d'interactions complexes entre de multiples partenaires cellulaires présents dans différents tissus et qui doivent migrer jusqu'aux sites tumoraux. Il en résulte que l'efficacité des immunothérapies doit être évaluée chez l'animal de laboratoire. Dans le cadre de ce projet, nous nous proposons de réaliser les études d'efficacité préclinique de différentes immunothérapies dérivées de notre technologie pour lutter contre le cancer. Pour réaliser ces études 960 rongeurs au maximum seront requis sur une période de cinq ans. Durant cette période huit immunothérapies seront évaluées seules ou en combinaison avec d'autres immunothérapies.

Dans le cadre de ce projet les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Nous serons attentifs à la règle des 3R afin de n'utiliser que le nombre minimum d'animaux nécessaire pour assurer la validité des expériences. Les animaux seront hébergés dans un environnement enrichi. Les cellules tumorales et immunothérapies seront injectées à des animaux qui auront été préalablement anesthésiés. L'impact des immunothérapies sur la progression tumorale sera suivi au cours du temps par mesure de la croissance tumorale. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué afin d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Les biopsies requises pour analyser la tumeur seront réalisées après euthanasie des animaux. L'application de critères d'arrêt et le suivi régulier des animaux hébergés en groupe permettront de garantir le bien-être des animaux.

**20315** La réalisation d'études de toxicologie et de pharmacologie de sécurité est une obligation réglementaire lors du développement d'un médicament humain. Ces études servent à évaluer la sécurité d'un médicament avant les premiers essais cliniques chez l'homme et doivent donc mimer le plus possible les futures conditions d'utilisation et d'évaluation clinique chez l'homme. Certaines études vont donc nécessiter des techniques d'administrations, de prélèvements ou de chirurgies particulières qui doivent être maîtrisées et validées par l'établissement qui va réaliser ces études précliniques. L'objectif de ce projet est le développement et la mise au point de nouvelles techniques d'administrations, prélèvements ou chirurgies chez le primate non humain. Des améliorations de techniques existantes peuvent aussi être faites dans un objectif de raffinement (techniques moins invasives, moins longues et donc bénéfiques pour le bien-être des animaux). Ce projet ne peut être réalisé en utilisant des méthodes alternatives (ex : ex vivo ou *in vitro*) car les conditions expérimentales des futures études précliniques réalisées *in vivo* doivent être validées. Le primate non humain est une des espèces non-rongeur utilisées dans les études de toxicologie/pharmacologie, il est donc nécessaire de développer des techniques sur cette espèce. Le nombre d'animaux pour ce projet est estimé à 200 pour une durée de 5 ans. Dans la mesure du possible : une première phase de validation des paramètres techniques sera réalisée sans utilisation d'animaux et des animaux déjà utilisés dans des projets antérieurs seront utilisés sur ce projet afin de réduire le nombre total d'animaux.

Pour améliorer leur bien-être, les animaux seront hébergés en groupes sociaux et auront à disposition des perchoirs ou barrières visuelles ou balançoires et divers jouets. Des mélanges de friandises sont distribués dans de la litière permettant aux animaux de fourrager. Un programme d'habituation des animaux est mis en place dès la première semaine d'arrivée afin d'acclimater les animaux à leur nouvel environnement, aux conditions d'hébergement et aux procédures. 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 seront appliquées de telle sorte qu'en cas de signes cliniques ayant un impact significatif sur le bien-être de l'animal, des mesures seront prises rapidement (mise en place d'un traitement analgésique, diminution de la dose testée, suspension de la procédure ou euthanasie).

**20316** Ce projet ne sera utilisé que lorsque l'on supposera que le phénotype de la nouvelle lignée créée pourrait être dommageable ou à posteriori si un phénotype dommageable était découvert sur une nouvelle lignée de façon inattendue.

Pour rappel une souris génétiquement modifiée est un animal dont le génome a été modifié par l'insertion ou le remplacement d'un ou plusieurs gènes. Lorsque l'on souhaite créer de nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées, les recommandations du décret 2013-118 (article R.214-89 et 110) nous imposent d'avoir un projet autorisé par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation, pour évaluer tout phénotype, ensemble des caractères observables d'un individu, qui pourrait être dommageable vis-à-vis du bien-être des animaux.

Afin de répondre à la réglementation en vigueur, l'objectif de ce projet est l'évaluation du caractère dommageable ou non de la modification génétique réalisée sur ces nouvelles lignées de souris génétiquement modifiées par croisement avec des lignées déjà existantes ou sur un fond génétique particulier et ceci afin de répondre à de nouvelles questions scientifiques en lien avec les thématiques de recherche de l'institut comme par exemple en oncologie, sur les maladies neurodégénératives, sur des pathologies de la grossesse ou sur des modèles de pathologies psychiatriques.

Au sein de notre institut, beaucoup d'équipes réalisent des élevages de modèles murins génétiquement modifiés et nous prévoyons d'utiliser, pour ce projet, un nombre total maximum de 602 souris. Ce nombre est proportionnel au nombre de nouvelles lignées à phénotype dommageable qui pourraient être générées sur 5 ans et que nous estimons à 7.

Tout sera fait dans ce projet pour prendre en compte au mieux la règle des 3R :

- Remplacement : aucun remplacement ne pourra être envisagé puisque ce projet sert à la création de nouvelles lignées et à l'évaluation du phénotype des animaux générés et il est donc impossible de le réaliser *in vitro* ou *in silico*.

- Réduire : pour réduire au maximum le nombre d'animaux, la production sera rationalisée par l'établissement de programmes d'élevage.

- Raffiner : les animaux présentant le génotype d'intérêt feront l'objet d'une surveillance particulière selon les recommandations de l'Union Européenne afin d'établir si ces créations de nouvelles lignées provoquent l'apparition d'un phénotype dommageable vis-à-vis du bien-être animal, et si c'est le cas, des points limites seront mis en œuvre et éventuellement réadaptés en fonction du phénotype observé pour limiter toute souffrance chez les animaux.

Les animaux sont hébergés en groupe dans un environnement enrichi. Ils sont observés quotidiennement et des points limites ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus pour lesquels il sera décidé de mettre en place un traitement approprié ou une euthanasie.

**20317** Le projet : La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive irréversible. C'est la première cause de démence chez la personne âgée. Les traitements actuels ne permettent ni de guérir ni même d'arrêter la progression de la MA. Au mieux, ils ralentissent l'évolution des symptômes. Afin de développer des traitements efficaces, il est aujourd'hui impératif de mieux comprendre la physiopathologie de la MA et d'explorer de nouvelles approches thérapeutiques.

Sur le plan physiopathologique, le cerveau des patients MA est caractérisé par la présence de plaques amyloïdes, dues à l'accumulation extracellulaire du peptide beta amyloïde (Abeta), ainsi que des enchevêtrements neurofibrillaires, causés par l'agrégation de la protéine tau hyperphosphorylée. Dans les phases précoces de la MA, des anomalies d'élimination du peptide Abeta via la barrière hémato-encéphalique et le liquide cérébro-spinal pourraient être à l'origine de l'accumulation anormale et progressive de formes agrégées toxiques pour les neurones. Une meilleure compréhension des mécanismes expliquant les défauts de clairance cérébrale est donc nécessaire afin de développer des thérapies efficaces à un stade précoce. Plusieurs études soulignent que la suppression de l'action de facteurs de croissance sur les neurones ralentit la progression de la pathologie amyloïde et corrige les déficits cognitifs de souris modélisant la MA ; un des mécanismes protecteurs est une meilleure élimination du peptide Abeta hors du cerveau.

Ce projet cherche donc à identifier les mécanismes cellulaires par lesquels certains facteurs de croissance impactent le processus de clairance cérébrale des toxines au cours du vieillissement. Notre projet étudie des mécanismes intégratifs faisant appel à de nombreux types cellulaires (neurone, glie, système vasculaire), des interactions cerveau/système endocrines ainsi que les processus de vieillissement : il est donc indispensable d'avoir recours à l'animal entier. En particulier, nous allons analyser, dans le cerveau, le comportement de diffusion de molécules fluorescentes de taille comparable aux agrégats d'Abeta. Pour une évaluation 3D dynamique *in vivo*

de la diffusion cérébrale, nous utiliserons l'imagerie par résonance magnétique (IRM). Nous allons examiner les échanges entre parenchyme cérébral et liquide céphalo-rachidien (LCR). L'étude prévoit aussi l'utilisation de la microdialyse pour déterminer la vitesse d'élimination d'Abeta de l'espace extracellulaire. A terme, ces travaux visent le développement de thérapies préventives contre la MA en contrecarrant l'accumulation anormale d'agrégats protéiques toxiques à l'origine des déficits cognitifs.

Les animaux :

\* Type : Souris transgéniques immunocompétentes.

\* Nombre : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 204 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 : Pour étudier les éléments mis en jeu dans le vieillissement cérébral et la pathologie Alzheimer, qui est au cœur de ce projet, il est indispensable d'avoir recours à l'animal entier. Il est pour l'instant impossible de recréer la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires rentrant en jeu dans un système artificiel, *in vitro*. Il est donc essentiel d'utiliser des modèles de souris knockout spécifique pour le gène d'intérêt ainsi que des souris modélisant la MA.

Là où c'est possible, nous préparons des banques d'organes pour avoir recours aux échantillons en stock et ainsi éviter systématiquement des expérimentations futures.

\* Réduction : Ce projet nécessite 204 souris sur 5 ans, le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé. Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal. À cause des variabilités interindividuelles et intergroupes, qui augmentent avec l'âge, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats non valides. Nous avons déterminé le nombre minimum d'animaux nécessaire pour cette étude, en tenant compte des données de la littérature et des effets statistiques. De plus, chaque animal est son propre témoin ce qui assure une réduction considérable du nombre d'animaux utilisés.

\* Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mises au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress par utilisation systématique de l'anesthésie, et recours à l'analgésie si nécessaire. 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 et d'abris 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.). Les définitions et critères pour arrêter les expériences excluent au maximum les douleurs.

**20318** Les problèmes cardiovasculaires et plus particulièrement les problèmes de rythme, sont les principales pathologies cardiaques développées à long terme après une exposition cardiaque à des doses modérées et fortes de rayonnements ionisants. Cependant encore très peu d'études expérimentales se sont intéressées au développement de ces pathologies après une exposition à de faibles doses de rayonnements ionisants (< 300mGy). Quelques études épidémiologiques récentes montrent une morbidité due à des pathologies cardiovasculaires de résidents vivant en zone contaminée et exposés à de faibles doses après l'accident de Tchernobyl, et d'autres études montrent une relation entre l'exposition au <sup>137</sup>Cs et le développement de trouble du rythme. Néanmoins, toutes ces études restent controversées car il est difficile de conclure à une relation de cause à effet en se basant uniquement sur les études épidémiologiques. Dans le cas des pathologies cardiaques du trouble du rythme, plusieurs études démontrent le lien entre le système

nerveux sympathique (SNS) et le cœur. En effet, une suractivation sympathique est essentielle dans le développement des remodelages et des dysfonctionnements cardiaques indésirables. Au vu de cette littérature, il paraît évident de cibler le système sympathique qui joue un rôle important sur l'inflammation, le remodelage vasculaire mais également sur la physiologie et le maintien de la fonction cardiaque. Nous émettons l'hypothèse qu'il existe un seuil pour lequel nous avons le développement de troubles du rythme dans le contexte de l'exposition faible à modérée et que cette pathologie cardiaque se développant longtemps après l'exposition, est due à un dysfonctionnement du SNS. Ce projet permettra d'alimenter le système de radioprotection en ayant pour objectif d'évaluer les effets de doses faibles à modérées de rayonnements ionisants à plus ou moins long terme sur le cœur et d'apporter des réponses très attendues quant aux questions des effets biologiques post-exposition, pouvant induire des pathologies non-cancéreuses comme les pathologies cardiaques. Nous utiliserons dans cette étude un modèle expérimental d'exposition externe aiguë en rayonnement gamma corps entier de souris qui mime une exposition environnementale à des doses faibles à modérées. Notre projet sera complémentaire aux études épidémiologiques et permettra d'apporter des réponses notamment dans les gammes de doses où les études épidémiologiques manquent de puissance statistique. Les résultats de cette étude permettront d'identifier un potentiel effet seuil et d'obtenir des données de caractérisation structurale, cellulaire, moléculaire ainsi que des voies de signalisation pouvant être impliquées à plus ou moins long terme dans ces processus de remodelage cardiaque à de faibles doses d'exposition et qui peuvent conduire à ces dysrégulations de la fonction cardiaque.

Ce projet respecte les principes énoncés par les 3R. Il prévoit l'utilisation de 567 souris sur 5 ans. En effet le nombre d'animaux utilisés correspond au minimum nécessaire pour obtenir un résultat scientifique valide et statistique. L'utilisation d'animaux est nécessaire car nous voulons connaître l'impact de rayonnements ionisants sur le développement d'une pathologie à l'échelle de l'organisme entier et l'étude sur les cellules n'est pas suffisamment représentative d'un organisme intégré (cardiomyocytes et fibres nerveuses associées) et ne peut mimer une pathologie globale, dans ces conditions, il n'est pas possible de s'affranchir de l'expérimentation animale. Nos souris sont hébergées en groupe dans un milieu enrichi en coton de nidification ; toutes les précautions sont prises afin d'assurer au mieux le bien-être de en réduisant au minimum leur stress lors des manipulations : les irradiations sont réalisées en état vigile, le suivi de la fonction cardiaque effectuée par échographie-doppler sera réalisée sous anesthésie volatile et les souris seront pesées régulièrement. Nous avons déterminé des critères d'arrêt précoces spécifiques de notre modèle : tout animal présentant des signes de douleur ou de dégradation de l'état général sera exclu de la procédure en cours.

**20319** 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"). Elles sont devenues la 3<sup>ème</sup> cause de mortalité dans les pays industrialisés après le cancer et les maladies cardiovasculaires et touchent environ 8% de la population dans ces pays dont 78% de femmes.

Parmi les maladies auto-immunes, celles avec des atteintes systémiques, telle que le lupus érythémateux systémique (SLE), restent très hétérogènes dans leur présentation, dans leur impact sur la qualité de vie, sur la survie des patients et sur la réponse aux traitements. Malgré l'évolution des traitements et l'apparition de nouvelles thérapies ces dernières années (ex - anticorps monoclonaux), les maladies auto-immunes et notamment les formes les plus sévères, sont encore mal prises en charge. 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.

Alors qu'il existe des modèles murins transgéniques récapitulant certaines observations cliniques, biologiques, biochimiques et histologiques faites chez l'Homme, ceux-ci peuvent parfois présenter quelques inconvénients : la majorité de ces modèles sont dits monogéniques (i.e. que la pathologie est causée par la seule modification d'un gène unique contrairement à certaines étiologies humaines), la plupart de ces modèles peuvent être longs (>20 semaines) avant de développer les premiers signes. Ils sont trop restrictifs et ne sont pas toujours représentatifs des cas cliniques. Il est donc nécessaire de développer d'autres modèles induits, plus représentatifs des maladies auto-immunes, et qui soient potentiellement plus courts.

Le but de ce projet est de mettre au point les conditions expérimentales puis valider un modèle de lupus systémique érythémateux (SLE) chez souris par l'injection unique de pristane, constituant principal de certaines huiles minérales à l'origine de maladies auto-immunes (arthrite, lupus) par une exposition chronique. Dans ce modèle, les souris développent de nombreuses caractéristiques du lupus : production d'auto-anticorps caractéristiques, altération de la fonction rénale, inflammation pulmonaire, une anémie et une arthrite tardive (>12 semaines après induction). De nombreuses données bibliographiques sont disponibles, permettant ainsi une internalisation rapide du modèle avec confirmation des conditions expérimentales classiquement réalisées.

L'ensemble de ce projet permettra d'évaluer la faisabilité du modèle, de collecter les premières données pertinentes et d'identifier les éléments éthiques et bien-être animal (points limites,).

Les études incluses dans ce projet prévoient des évaluations cliniques, fonctionnelles (échographies) et biologiques (prélèvements sanguins répétés pour dosage de biomarqueurs). Ces prélèvements sont adaptés en termes de volume/fréquence lors de la validation de chaque modèle, conformément aux standards éthiques et réalisés avec les méthodes les moins contraignantes possibles (ex – prélèvement répétés à la veine saphène).

La cytométrie en flux (FACS) réalisée sur le sang et les organes cibles nous permettra de suivre la production des cellules immunitaires.

Les objectifs de ce projet sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire et raffiner) :

Remplacement –

L'efficacité thérapeutique d'un candidat médicament ne peut être démontrée qu'après administration chez l'animal. Seuls les candidats médicaments les plus aboutis et les plus avancés dans leur développement sont administrés *in vivo* après présélection *in vitro*. Les pathologies auto-immunes sont par essence multifactorielles, impliquant un grand nombre de types cellulaires et de médiateurs, qu'il n'est pas possible de modéliser complètement *in vitro*. Le recours à l'animal est indispensable pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, impliquant l'ensemble des mécanismes physiopathologiques.

Réduction – Pour chaque souche, le protocole d'étude (évaluations fonctionnelles, biologiques, ...) et le nombre d'animaux seront limités à leurs minimums, en adéquation avec les paramètres d'études et le degré de mise au point (souche de souris, dose, voie d'administration, type d'adjuvants, durée du modèle, ...). Les données collectées dans la littérature et les études préliminaires déjà réalisées par le groupe en externe seront primordiales pour débiter la mise au point de chaque modèle. Le nombre d'animaux utilisés sera ensuite adapté en fonction de l'étape de mise au point avec un accompagnement par le service Biostatistique sur les designs expérimentaux, variabilité des paramètres et in fine le nombre d'animaux nécessaire par groupe. Des méthodes d'investigation non invasives comme l'échographie permettront d'évaluer de manière longitudinale la morphologie et la taille des principaux organes cibles des maladies auto-immunes (reins, rate, ganglions lymphatiques, glandes salivaires, peau, poumons) sans euthanasie intermédiaire. En partie terminale, ces organes seront prélevés pour mettre en parallèle les évaluations échographiques et post-mortem. Cette évaluation échographique permettra par la suite de réduire la durée de l'étude et le nombre d'animaux.

Raffinement –les recueils d'urine pour examens biologiques seront réalisés sur litière de sable hydrophobe en remplacement des cages à métabolisme, maintenant ainsi les animaux dans de meilleures conditions de stabulation et pour une durée maximum de 4h pour limiter le stress. Les prélèvements de sang seront réalisés par ponctions à la veine saphène (technique rapide, peu stressante et avec un petit volume prélevé) en respectant les recommandations de la SBEA et du Comité d'éthique.

Un suivi quotidien des animaux sera réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin afin d'identifier tout signe de souffrance et d'appliquer les mesures nécessaires au soulagement des animaux en cas d'atteinte de points limites prédéfinis. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux et disposeront de matériel d'enrichissement adapté.

Enfin des études *ex vivo* et *in vitro* seront réalisées en fin d'étude afin d'investiguer les voies biologiques mises en œuvre dans ces modèles en caractérisant par exemple les lignées immunitaires impliquées ou bien en évaluant l'expression de certaines cibles.

Ce projet permettra d'internaliser et valider la pertinence d'un modèle induit de maladie auto-immunes sur des souches de souris non génétiquement altérées, dans l'objectif de le mettre en œuvre pour la recherche de nouveaux candidats médicaments. Il est classé de manière prospective en degré de gravité sévère.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 160 souris sur un maximum de 5 ans. Le nombre de rongeurs utilisés est calculé en fonction des données disponibles (bibliographie, données externes) et de la variabilité des paramètres examinés.

**20320** Ce projet s'inscrit dans la continuité d'un projet déjà mené au sein du laboratoire, dont l'objectif est d'identifier, dans un modèle préclinique chez la souris C57BL/6J, des indicateurs biologiques moléculaires, à valeur prédictive de la survenue d'une brûlure radiologique, et pronostique du degré de sévérité encouru, lors de situations d'exposition accidentelle à de fortes doses de rayonnements ionisants. Le présent projet vise à déterminer le pouvoir informatif de certains marqueurs moléculaires à des temps tardifs jusqu'à 3 mois post-irradiation, et leur association avec l'évolution de la lésion et le processus cicatriciel.

A l'aide d'un modèle de brûlure radiologique établi chez la souris, les microARN (petits ARN non-codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes) présents dans les fluides biologiques (sang, urine) seront analysés à différents temps en réponse à une exposition à différentes doses de rayonnements ionisants. Une série de marqueurs microARN sanguins a été précédemment identifiée, associée à l'état pathologique des animaux à j+14 post-exposition aux rayonnements ionisants. Dans le but de valider la pertinence à moyen terme de ces nouveaux indicateurs biologiques dans les fluides corporels associés à l'évolution des lésions et au le suivi des individus au cours du processus de cicatrisation, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*.

Pour ce projet, le nombre maximum estimé d'animaux est de 120.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, ce protocole expérimental est établi avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (irradiation des animaux sous anesthésie, surveillance des animaux avec établissement de scores et de points-limites, ...). Différents paramètres fonctionnels seront mesurés par les techniques non invasives pour évaluer l'intégrité tissulaire et vasculaire. D'autres analyses seront réalisées sur des prélèvements faits sur animal euthanasié.

**20321** L'une des compétences du laboratoire depuis de nombreuses années est la génération d'anticorps polyclonaux, qui permettent la mise au point de tests rapides antigéniques de diagnostic et la détection dans des domaines tels que les maladies infectieuses, la biosécurité et la biosûreté. Il s'agit par exemple de développer des dispositifs permettant la détection sur le terrain de virus émergents comme le SARS-CoV2 ou le virus Zika. Il peut s'agir également de l'identification de

bactéries pathogènes comme les Salmonella qui sont la cause de graves infections alimentaires et qu'il est nécessaire de détecter dans les produits alimentaires.

Les outils de détection rapide et facilement déployables sur le terrain sont nécessaires et demandés par l'Organisation Mondiale de la Santé pour limiter la diffusion des épidémies. Le manque de dispositifs de ce type a par exemple été souligné durant les dernières épidémies. Par ailleurs, les anticorps polyclonaux sont aussi utilisés comme des outils importants dans nos projets de recherche. Les sujets concernés sont tous sélectionnés sur des critères scientifiques et de pertinence par les diverses agences de financement au niveau national ou international, Il faut souligner qu'il n'existe pas d'alternative à l'utilisation de l'animal pour obtenir des anticorps polyclonaux, à l'échelle du laboratoire, ils sont générés par immunisation de lapins.

Les animaux requis pour notre projet de recherche sont au maximum 100 sur 5 ans correspondant à l'obtention d'environ 50 anticorps (sur la base de deux lapins par anticorps) ; ils sont nés et élevés en captivité à des fins scientifiques dans un élevage agréé. Nous veillerons à n'utiliser que le nombre minimal utile d'animaux pour assurer l'obtention des quantités d'anticorps strictement nécessaires aux applications recherchées et à la validité des expériences. Les antigènes seront injectés en présence d'adjuvant destiné à améliorer la réponse immunitaire (et plus spécifiquement la production des anticorps polyclonaux spécifiques) et donc à globalement diminuer le nombre d'animaux nécessaire. Le niveau et le type de réponses immunitaires induites seront évalués pour chaque animal après prélèvement sanguin.

L'état de santé et le bien-être des animaux seront surveillés tout au long des procédures. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans ce cas, le vétérinaire référent sera alerté afin de mettre en œuvre les interventions appropriées. Les animaux hébergés individuellement bénéficient d'une surveillance quotidienne et d'un enrichissement du milieu avec des cages comportant des plateformes surélevées et la mise à disposition de boules compactées de cellulose.

**20322** Une des caractéristiques du trouble lié à la consommation de drogue d'abus est la présence de troubles moteurs. L'agitation est en effet le deuxième motif le plus fréquent d'orientation des patients vers les urgences après l'anxiété. Un nombre important de patients peuvent être tolérants à ces symptômes malgré l'usage chronique de la drogue. Par conséquent, empêcher l'escalade de la consommation semble une option thérapeutique pertinente mais négligée, contre ces complications. Nous souhaitons dans le cadre de ce projet caractériser le rôle de deux gènes cérébraux dans les phénomènes de tolérance locomotrice chez le rat. Pour cela nous réaliserons une extinction ciblée de ces gènes afin d'étudier la tolérance locomotrice de trois drogues. Le nombre total de rats nécessaire à la réalisation de ce projet est de 909 pour une durée de 5 ans.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3Rs et met en jeu des procédures chirurgicales, d'administrations répétées de drogue et de tests de comportement.

Remplacement : A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode de remplacement permettant de reproduire la complexité du cerveau, ce qui rend l'utilisation d'un modèle animal indispensable à la réalisation de ce projet.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est le minimum nécessaire permettant une analyse statistique robuste des résultats.

Raffinement : Les gènes sont ciblés et pour éviter toute souffrance, les procédures de chirurgie se feront sous analgésie et anesthésie générale. Les rats seront observés quotidiennement et 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, les résultats issus de ce projet nous permettront de mieux comprendre le rôle des deux gènes étudiés dans un objectif clinique d'améliorer la prise en charge de la toxicomanie.

**20323** Face à la demande croissante des consommateurs en produits de la mer, l'aquaculture est un secteur en pleine expansion au niveau mondial. En France, la pisciculture marine se distingue par le savoir-faire de ses écloseries, qui exportent à l'international. Cette filière est confrontée à des épisodes infectieux dus à des agents pathogènes qui impactent les élevages de bars européens (ou bar commun ; *Dicentrarchus labrax*), de daurades royales (*Sparus aurata*) ou encore de maigres (*Argyrosomus regius*). Les mortalités et morbidités induites ont un impact sur le bien-être animal et la productivité. Pour répondre à ces menaces, contribuer à la réduction de l'usage d'antibiotiques en nutrition animale et valoriser les ressources naturelles, le développement et l'utilisation de probiotiques, complément microbien vivant qui a un effet bénéfique sur l'hôte, représentent une solution innovante et durable.

Des souches bactériennes isolées de l'environnement marin ont démontré *in vitro* des propriétés intéressantes d'inhibition de la croissance de plusieurs bactéries pathogènes d'animaux aquatiques. Des expérimentations menées sur crevettes et Tilapias ont confirmé la capacité de ces souches à rendre les animaux plus résistants à des épisodes infectieux mais également à améliorer leurs performances de croissance. L'objectif de ce projet est de caractériser les potentiels effets positifs induits par deux produits probiotiques intégrés dans l'alimentation en comparaison avec un aliment classique. Des bars, des daurades et des maigres (5-10 grammes) seront supplémentés quotidiennement pendant 8 semaines avec les candidats probiotiques en intégrant des analyses régulières de plusieurs paramètres (croissance, immunité, évolution du microbiote de différents tissus dont l'intestin et les branchies, ...). Une partie d'entre eux sera maintenue en grossissement jusqu'à un poids de 25 à 50 grammes pour déterminer le gain en terme de croissance par rapport aux lots contrôles. L'autre partie sera soumise à des stress qu'ils sont susceptibles de rencontrer en élevage (infections bactériennes ou virales, stress thermique) pour déterminer si la supplémentation avec les probiotiques améliore leur capacité de résistance. Un total de 17 860 poissons juvéniles (11 800 bars, 4260 daurades et 1800 maigres) seront utilisés.

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 en circuit ouvert 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, l'intégration de couvercles sur une partie des bassins pour générer des zones d'ombres. La nécessité de reproduire *in vivo* le potentiel effet protecteur de ces souches, déjà identifié chez les crevettes et les Tilapias, sur trois espèces marines majeures de poissons ne permet pas de remplacer l'utilisation d'animaux. Ces essais sont également nécessaires pour obtenir une autorisation de commercialisation de ces probiotiques auprès de l'Agence Européenne de Sécurité Alimentaire (EFSA).

**20324** Le programme de recherche proposé a pour but de mieux comprendre le rôle physiopathologique de l'oncogène FAT10 dans les hépatocytes dans le développement de la stéatose hépatique non-alcoolique (NAFLD) et des formes sévères et inflammatoires, appelées stéatohépatite non-alcoolique (NASH), prédisposant fortement à des maladies hépatiques invalidantes telles que la cirrhose hépatique et l'hépatocarcinome. L'étude des mécanismes physiopathologiques de la NASH nécessite des études sur organisme entier qui ne peuvent être réalisées que par le biais de modèles animaux adaptés. Dès que cela sera possible, nous envisageons une méthode alternative telle que l'utilisation de modèle *in vitro* (REPLACER). Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique qui est évalué à 2092 souris sur 5 ans (REDUIRE). Les mâles seront utilisés dans nos expériences car ils sont plus sensibles métaboliquement au régime induisant la NASH. D'une manière générale, nous utiliserons des groupes n=10 et principalement des analyses non-paramétriques (REDUIRE). Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (4 souris par cage ; présence de petite maison pour améliorer leur bien-être) (RAFFINER). Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne

présentent aucun problème physique ou physiologique. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites (RAFFINER):

- Perte de poids de 15% pour les souris minces déterminée après pesée des animaux et pour une souris obèse perte de poids correspondante au maximum à 15% de perte de poids d'une souris mince correspondante (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau)
- Apparence physique externe (pilo-érection, 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 dans une salle dédiée par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

**20325** Le paludisme est la maladie parasitaire la plus meurtrière au monde, puisqu'elle tue environ 435,000 personnes par an, principalement des enfants de moins de cinq ans en Afrique subsaharienne. Cette maladie est due à un parasite eucaryote unicellulaire, appelé plasmodium, dont il existe plusieurs espèces.

Le parasite est transmis à l'homme pendant la pique infectante d'un moustique femelle hématophage Anophèle, le vecteur de plasmodium. Après une phase de multiplication dans le foie, le parasite infecte les globules rouges / érythrocytes. Les cycles répétés de multiplication du parasite à l'intérieur des globules rouges sont responsables de tous les symptômes et complications de la maladie.

Il n'existe pas actuellement de système *in vitro* qui permette d'obtenir le cycle de vie complet de plasmodium. Cependant il existe des modèles animaux du paludisme, reconnus depuis les années 1950, qui sont extensivement utilisés en laboratoire. Les espèces de plasmodium les plus utilisés sont *P. berghei*, *P. yoelii* et *P. chabaudi* car elles sont adaptées aux moustiques et aux rongeurs de laboratoire.

Notre activité vise à produire en masse deux espèces d'Anophèles, *An. Stephensi* et *An. Coluzzii* (souche N'Gouso), vecteurs naturels de *Plasmodium falciparum*, le parasite responsable des formes graves de paludisme. Nous réalisons également des contrôles d'infections hebdomadaires de *A. stephensi* avec *P. berghei* pour évaluer la « santé » des moustiques que nous fournissons (leur réceptivité à l'infection par le parasite et leur survie à cette infection) et par conséquent la qualité des résultats issus d'expériences utilisant ces moustiques et les différents stades parasitaires isolés à partir de celles-ci.

Nous estimons le nombre rats et souris auxquels nous aurons recours, à environ 1445 (25 rats et 1420 souris) sur 5 ans. Les animaux seront des femelles et âgés de 3-4 semaines.

Ce projet concerne spécifiquement l'utilisation d'animaux de laboratoire pour générer les parasites à travers trois procédures expérimentales de sévérité légère :

Procédure 1 : Préparation d'échantillons cryo-préservés de sang de rat infecté par *P. berghei* ANKA GFP 25 rats. Pour cette procédure nous utilisons des rats car leur volume sanguin est plus important que celui des souris. Ainsi nous réduisons le nombre d'animaux utilisés

Procédure 2 : Contrôle de qualité des stabilats et détermination de la dose optimale d'injection 120 souris

Procédure 3 : Infection des moustiques avec *P. berghei*-GFP 1300 souris

L'inconfort et la souffrance des animaux seront limités par le recours à des anesthésiques, et l'arrêt des expériences avant l'apparition des symptômes du paludisme chez les rongeurs infectés.

Nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaires pour nos expériences.

**20326** 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 21<sup>ème</sup> siècle des épidémies de maladies respiratoires graves chez l'homme. Un nouveau coronavirus nommé « SRAS-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 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 SRAS-CoV-2 par ces vecteurs lentiviraux. Les résultats obtenus chez la lignée de souris de laboratoire 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.

Les réponses cellulaires obtenues dans les lignées murines consanguines ne reflètent ni la spécificité, ni la diversité que l'on peut observer chez l'homme. Afin de se rapprocher le plus possible du contexte humain, nous allons utiliser des souris transgéniques pour le récepteur du virus et pour 2 molécules qui sont impliquées dans la réponse immunitaire chez l'homme. Nous disposons de deux lignées de souris différentes. Nous comparerons la sensibilité à l'infection et les réponses immunitaires développées chez ces deux lignées de souris, de façon à valider ces nouveaux modèles animaux et éventuellement sélectionner le meilleur des deux. Les lignées ainsi validées seront des outils uniques qui pourront être utilisés pour explorer les réponses à l'infection au SRAS-CoV-2 et aux autres virus qui utilisent le même récepteur. Elles permettront également de tester l'efficacité de vaccins contre des infections par le SRAS-CoV-2 (en particulier contre les infections aux différents variants de ce virus) et par les virus qui utilisent le même récepteur.

Ce projet comprend une procédure unique de classe de sévérité modérée incluant 120 souris, destinée à étudier les réponses immunitaires cellulaires et humorales induites par deux vecteurs dont l'efficacité prophylactique a déjà été démontrée dans d'autres modèles précliniques. 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.

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, 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 basée sur des tests statistiques appropriés, recommandés par un expert en bio-statistiques. Le nombre estimé d'animaux utilisés dans ce projet est de 120 souris, 1 procédure expérimentale sur une période de 5 ans.

Raffiner: 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. Des signes cliniques ont été définis comme points limites. Les animaux seront mis à mort s'ils atteignent ces points limites.

**20327** Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie auto-immune dont l'incidence augmente de +3-4% par an dans la plupart des pays, incluant la France. Le traitement du diabète repose sur une thérapie de remplacement consistant à injecter plusieurs fois par jour de l'insuline, qui n'est plus sécrétée en raison de la destruction auto-immune des cellules qui la produisent dans le pancréas. L'un des enjeux majeurs de la recherche sur le diabète est la mise en place de traitement bloquant directement le processus auto-immun, pour prévenir la maladie. Afin d'obtenir un ratio bénéfice/risque en faveur du patient, les approches thérapeutiques de type vaccinal seront privilégiées en utilisant un nouveau modèle de souris humanisées dont le bloc de présentation est complètement humanisé et spécifique du DT1. La souris humanisée ne développe pas spontanément de diabète mais l'introduction d'une modification génétique permet d'en faire une souris développant spontanément un DT1 ressemblant au diabète humain. Le but de ce projet est de caractériser dans ces souris les fragments de la préproinsuline qui sont présentés aux cellules immunitaires par les molécules humaines, d'utiliser ces caractérisations pour développer de nouveaux tests biologiques permettant de diagnostiquer ou prédire l'auto-immunité chez les patients diabétiques afin de prévenir le diabète.

Application de la règle des 3R :

Raffinement : Avant d'être testées chez la souris, les séquences des peptides candidats seront optimisées par modélisation informatique pour leur affinité envers la molécule d'intérêt. Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire, les souris des deux sexes seront utilisées par groupes d'étude de 6 ou 12 souris permettant une validité statistique de l'ensemble du projet.

Remplacement : Afin de limiter le nombre de souris à utiliser, nous avons développé des systèmes cellulaires *in vitro* dans nos tests cellulaires.

Un total de 726 souris est nécessaire pour le développement de ce projet sur 5 ans. Les interventions pratiquées chez les animaux seront : des injections intra-péritonéales ou sous-cutanées, ainsi que des prélèvements de sang à la base de la queue, avec des aiguilles très fines afin de réduire au maximum la douleur et l'inconfort, des injections de micro-volume avec des aiguilles très fines afin de réduire au maximum la douleur/l'inconfort des injections. Les animaux seront soumis à un régime gras pour le déclenchement d'un diabète de type 2.

Nous espérons par ce projet identifier des peptides à fort potentiel vaccinal, démontrer que la régénération des cellules productrices d'insuline est possible dans le contexte d'un diabète auto-immun sans risque pour le patient et mettre au point de nouveaux outils de diagnostic plus précoces de la maladie.

**20328** Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent des cellules nerveuses. De plus en plus de preuves scientifiques indiquent qu'outre les cellules nerveuses, les cellules immunitaires résidentes du système nerveux central pourraient jouer un rôle prépondérant dans l'équilibre du système nerveux central et sa capacité à modifier son fonctionnement pour maintenir un fonctionnement optimum en cas de changement de l'environnement (Ex perte de goût ou d'odorat...). Pourtant les mécanismes et les voies de signalisation par lesquelles les cellules nerveuses et immunitaires interagissent sont peu connus. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules immunitaires dans ces mécanismes de plasticité et du maintien de l'équilibre du système nerveux. Nous étudierons les cellules immunitaires grâce à un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements des cellules immunitaires seront étudiés par imagerie cellulaire sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules immunitaires nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent pendant la réorganisation du système nerveux suite à des privations sensorielles.

Il s'agit d'un projet de recherche fondamental dont les résultats bénéficieront à la connaissance générale du système nerveux central, et permettront de mieux comprendre les interactions entre le système nerveux et le système immunitaire. Les résultats attendus de cette recherche permettront de mieux comprendre les processus cellulaires conduisant aux pathologies neurodégénératives du système nerveux central et aux troubles engendrés par l'auto-immunité.

Chaque animal recevra une chirurgie sous anesthésie générale permettant la pose d'un implant crânien, une analgésie est prodiguée aussi longtemps que nécessaire jusqu'à la récupération totale de la chirurgie en général 48 heures maximum. Les souris seront ensuite habituées à l'immobilité par renforcement positif (récompenses) afin d'être imagées au travers du crâne, notre approche est donc non invasive et à ce titre très bien tolérée par les animaux. Les différentes molécules seront injectées par voie intrapéritonéale. Les molécules sont issues de la pharmacopée utilisée chez l'homme et donc avec peu d'effets secondaires indésirables. Afin d'entraîner une plasticité des modalités sensorielles de façon physiologique, une privation de la vue temporaire sera réalisée. La procédure est classée modérée.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Le nombre de souris utilisé sera contenu (280 souris pour 5 ans). Notre étude impose des conditions physiologiques et une absence d'inflammation ce qui nous contraint à l'utilisation d'un modèle *in vivo* non-invasif. Une fois les voies de signalisations identifiées, l'étude des mécanismes sera réalisée *in vitro* (Remplacer et Réduire). En termes de raffinement, il est à noter que ce modèle peu invasif ne semble pas induire de stress ou de souffrance des souris. Néanmoins, nous veillerons à limiter le mal être des animaux par un enrichissement de leurs conditions de vie, en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. En complément, le bien-être des animaux sera évalué de façon quotidienne (posture, poids, toilettage). Les privations visuelles peuvent être obtenues par différentes méthodes nous avons porté une attention particulière à cette procédure et choisi l'approche la moins traumatisante possible pour l'animal. Nous allons privilégier la prise orale des composés pharmaceutiques quand c'est possible, au lieu de l'administration par injection qui peut être une source de stress pour l'animal. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes cellulaires mis en jeu durant les sollicitations sensori-motrices.

**20329** La carcinose péritonéale est une évolution commune de plusieurs tumeurs intestinales et gynécologiques métastasantes dans le péritoine. Sans intervention, son pronostic est sombre avec une survie médiane de seulement quelques mois.

Ce projet vise à développer des thérapies plus efficaces pour le traitement de la carcinose péritonéale dérivant du cancer ovarien (CPO) et du côlon (CPC) chez le modèle rongeur rat.

Les thérapies sont constituées de nanoparticules innovantes qui sont chargées avec les médicaments anticancéreux oxaliplatine et doxorubicine (déjà beaucoup utilisés en clinique pour le traitement des carcinoses péritonéales). Ces nanoparticules seront administrées par trois voies différentes : voie systémique intraveineuse (IV), voie locale par injection intrapéritonéale (IP) et voie locale par nébulisation intrapéritonéale.

Dans le cas de la voie locale, l'objectif est de concentrer le médicament au niveau des métastases péritonéales pour un temps prolonger, d'améliorer la pénétration dans la tumeur, et ainsi diminuer la fréquence d'administration et augmenter l'efficacité thérapeutique.

Deux modèles de rats sont utilisés : rats nus athymiques pour l'étude de la CPO, et rats Wistar Albino Glaxo/ Rija pour l'étude de la CPC.

Le projet est divisé en 6 procédures qui visent à i) prendre en main le modèle de CPO (procédure 1) et CPC (procédure 2) par injection IP des cellules tumorales et suivi du développement de la tumeur; ii) acquérir des données de biodistribution *in vivo* de nanosystèmes (procédure 3 chez rats sains et procédure 4 chez rats atteints de CPO et/ou CPC); iii) obtenir des profils pharmacocinétiques des nanosystèmes et les comparer aux traitements conventionnels chez rats sains (procédure 5); et iv) évaluer l'efficacité thérapeutique des nanosystèmes chez rats atteints de



CPO et/ou CPC (procédure 6). Les traitements sont toujours administrés par IV, IP et nébulisation intrapéritonéale.

Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R.

Dans une démarche de remplacement l'efficacité et la toxicité des nanoparticules ont été largement étudiées et sont bien maîtrisés *in vitro*. L'évaluation des nanoparticules sur le modèle rongeur est la dernière étape de validation nécessaire pour la potentielle translation vers des applications cliniques.

Dans une démarche de réduction (stratégie GO/NO GO) les études seront faites de manière séquentielle afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Le nombre de rat prévu pour le projet est au maximum de 1749 rats. Le projet se déroulera sur une période de 5 ans. Pour chaque procédure décrite dans la saisine, nous avons identifié le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. En premier lieu, les modèles de carcinose péritonéale ovarienne et du côlon seront caractérisés chez le rat. Ensuite les nouvelles thérapies seront évaluées si les résultats obtenus justifient la poursuite du projet. Un suivi ponctuel des animaux sera fait sur toute la durée du projet.

Dans une démarche de raffinement, les points limites ont été identifiés et pour éviter toute souffrance, les animaux seront sous anesthésie générale et analgésie lors de toutes procédures et ils seront mis à mort à la fin de chaque procédure. Un suivi quotidien est prévu afin de détecter rapidement tout signe de souffrance. Les animaux seront hébergés dans un milieu protégé afin de limiter le risque d'infection. Les animaux seront mis à mort si un point limite est atteint.

**20330** Diverses maladies affectant le système nerveux central ont une origine génétique qui a pour conséquence la surexpression de protéines spécifiques qui sont cruciales en quantités physiologiques mais qui deviennent pathologiques lorsque leurs quantités dépassent les normes homéostatiques.

Différentes pathologies se retrouvent dans cette catégorie. Notamment, la maladie de Pelizaeus-Merzbacher (PMD) qui est une leucodystrophie liée au chromosome X, résultant dans la majeure partie des cas, d'une duplication du gène de la protéolipo protéine 1 (PLP1) dont les quantités excessives mènent à la perte de la gaine de myéline. A ce jour, les patients souffrants de ces pathologies ne reçoivent que des traitements palliatifs visant à soulager leurs douleurs et à améliorer quelque peu leur qualité de vie mais qui ne permettent pas d'éviter une fin fatale.

L'absence d'un traitement ciblé contre les maladies génétiques résultantes de la surproduction de protéines spécifiques, nous a incité à vouloir mettre au point une nouvelle approche thérapeutique basée sur l'interférence à ARN (siRNA). Quoique les siRNA sont actifs à faible dose, ils sont dégradables rapidement dans les milieux biologiques. Nous avons développé une méthode d'encapsulation des siRNA en les couplant à un précurseur du cholestérol, le squalène (SQ), et avons montré l'efficacité et la non toxicité des nanoparticules (NPs) obtenues dans plusieurs modèles de cancers et de maladies du système nerveux périphérique. Cependant, l'acheminement de molécules actives au système nerveux central n'est pas évident puisque la barrière hématoencéphalique leur entrave le chemin. Pour cela, deux méthodes d'encapsulations seront testées : les siRNA conjugués au squalène administrable par voie intraveineuse ou encapsulés dans des microparticules de silice (MP Si) qui peuvent être administrés par pulvérisation intranasale. Le nombre de souris nécessaires est de 360 souris.

L'acheminement des siRNA au système nerveux central représente un espoir et une promesse de guérison pour tous les patients souffrants de maladies causées par la surproduction de protéines. Cela représente aussi un espoir pour les maladies à caractère dominant comme la maladie de Huntington, où les individus hétérozygotes possédant une copie saine du gène mais qui est masquée par la copie mutée causant la maladie.

Ce projet sera mis en œuvre dans le respect de la règle des « 3R » :

1) REMPLACER : Les modèles de culture cellulaire ne peuvent reproduire avec fidélité et précision la complexité et la performance du système nerveux central et de sa barrière hématoencéphalique

qui représentent les bases de nos études. De ce fait, nous sommes sous l'obligation d'avoir recours à un modèle murin transgénique pour pouvoir mener à terme nos travaux de recherche.

2) REDUIRE : Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet.

3) RAFFINER : Afin de minimiser la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale et des points-limites sont établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. De plus, les animaux seront hébergés dans des conditions standards avec des enrichissements à leur disposition.

En cas de succès, ce projet prometteur aura des applications cliniques tangibles qui soulageront des patients dont les besoins ne sont toujours pas satisfaits.

**20331** Les tauopathies, parmi lesquelles la maladie d'Alzheimer, sont des maladies neurodégénératives caractérisées par l'agrégation de protéine Tau. Mis à part ce marqueur pathologique commun, les tauopathies présentent une grande diversité, tant sur le plan clinique qu'anatomo-pathologique. A ce jour, elles restent sans traitement car leurs causes restent inconnues. Une meilleure compréhension de leurs mécanismes pathologiques est donc un défi majeur de santé publique. Le projet présenté ici a pour but de mieux comprendre comment les cellules voisines des neurones, les astrocytes et les cellules endothéliales, sont affectées par la pathologie. L'étude de l'interaction de ces cellules dans les tauopathies et l'évaluation de leur dysfonctionnement pourraient permettre l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques et le développement de nouveaux traitements de la maladie d'Alzheimer et des tauopathies en général.

Les agrégats de la protéine Tau sont une lésion caractéristique des Tauopathies qui affectent les neurones et leurs connections. Dans le cerveau, des cellules spécialisées ont pour fonction d'éliminer les neurones morts ou les connections neuronales défectueuses. Parmi elles, les astrocytes jouent un rôle essentiel de maintien fonctionnel de ces connections synaptiques. Notre hypothèse est qu'au cours de la pathologie, les astrocytes entrent en jeu pour nettoyer le cerveau en engageant les récepteurs de phagocytose MERTK et MEGF10.

Dans une première partie de notre projet, nous déterminerons si agir sur ces voies de dégradation par phagocytose peut avoir un effet thérapeutique. Pour cela, nous modulerons ces voies par transfert de gène dans des modèles de Tauopathies développés chez la souris. Grâce à des méthodes de comptage de cellules sur coupes histologiques, nous évaluerons d'abord la survie des neurones et des astrocytes, ainsi que l'intégrité des connections neuronales et des jonctions glio-vasculaires. Enfin, nous évaluerons si ces traitements peuvent restaurer des fonctions cognitives normales, en particulier au niveau de la mémoire sur des modèles transgéniques en effectuant des tests de comportement. Dans une deuxième partie du projet, nous déterminerons comment l'ingestion de plaques amyloïdes (autre lésion typique de la maladie d'Alzheimer) par les astrocytes modifient ensuite leur capacité de dégradation des synapses et agrégats protéiques toxiques. Grâce à des méthodes d'analyses transcriptomiques et protéomiques, nous déterminerons quelles voies moléculaires sont modifiées au sein des astrocytes en présence des lésions beta-amyloïde et Tau. Pour cela, nous utiliserons un modèle de la maladie d'Alzheimer généré chez la souris transgénique APP/PS1 dans lequel la tauopathie est induite par transfert de gène avec un vecteur viral. Nous isolerons les astrocytes de la région lésée et réaliserons une analyse du profil d'expression des gènes, afin d'identifier les voies moléculaires qui sont modifiées. Nous identifierons un gène candidat et corrigerons son expression au moyen de vecteur viraux dans ce même modèle de la maladie d'Alzheimer. Nous évaluerons l'efficacité thérapeutique de cette correction en examinant l'étendue des lésions mais aussi la survie des neurones et des astrocytes dans le cerveau.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées chez lesquelles il est possible d'induire l'agrégation de la protéine Tau, de rendre les différentes cellules du cerveau fluorescentes afin de suivre leur évolution au cours de la pathologie, et de moduler l'expression de protéines impliquées dans la communication intercellulaire. Le recours à l'animal reste indispensable pour notre projet car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau. En particulier, les systèmes en culture ou

synthétiques ne permettent pas d'analyser les interactions structurelles et fonctionnelles entre les différents types de cellules dans le cerveau qui sont ici essentielles.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés et de notre élevage interne. Pendant les 5 années que durera l'étude, nous prévoyons d'utiliser 390 animaux pour des expériences de biochimie, 1046 pour des expériences d'histologie, 120 pour des analyses transcriptomiques, 270 pour des tests de comportement et 160 pour des analyses protéomiques, soit un total de 1986. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux sera réduit au minimum nécessaire permettant une interprétation statistique fiable des résultats. Quand cela est possible, les animaux font l'objet d'analyses multiples afin de diminuer leur nombre. Une première procédure visera à améliorer la prise en charge de la douleur suite aux différents protocoles chirurgicaux permettant la surexpression de protéines pathologiques. Tous les protocoles chirurgicaux prévus sont réalisés sous anesthésie générale avec une prise en charge de la douleur péri et post-opératoire approuvée par une équipe vétérinaire.

L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir le bien-être des animaux. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Le recours à l'animal reste indispensable pour notre projet car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale des cellules du cerveau en particulier leurs interactions structurelles et fonctionnelles dans un animal adulte. Enfin, notre projet vise à étudier des symptômes comportementaux qui ne peuvent être évalués que sur l'animal vivant.

**20332** Un apport excessif de glucose conduit à un phénomène de toxicité qui initie à terme une hyperglycémie chronique menant au développement d'un diabète de type 2. Parmi les mécanismes impliqués, le glucose peut jouer un rôle direct par une modification des protéines. Une perturbation de cette voie peut conduire au développement de maladies tels que le diabète, l'obésité ou encore le développement de cancer. Cette voie et le rôle de son enzyme clé, qui sera notre protéine d'intérêt, restent cependant peu compris.

Dans ce contexte, les objectifs de notre projet sont de:

- caractériser le phénotype des lignées de souris invalidées pour la protéine d'intérêt dans le foie et dans les cellules myéloïdes
- déterminer le rôle et l'importance de cette voie métabolique au niveau du foie dans le développement de l'inflammation et des nodules hépatiques et de caractériser ces nodules hépatiques
- identifier les acteurs moléculaires et les voies de signalisation capables de prévenir la formation de ces nodules hépatiques et le développement d'une inflammation
- mieux comprendre les mécanismes conduisant à une hyperprolifération conduisant au développement des nodules et à terme possiblement à des hépatocarcinomes

Pour cela 576 animaux issus de 3 lignées de souris génétiquement invalidées pour la protéine d'intérêt dans le foie et dans les cellules myéloïdes, lignées qui ne présentent pas de phénotype domageable seront utilisés sur une durée de 5 ans.

Une des lignées nécessite l'injection de tamoxifène afin d'invalider notre gène d'intérêt. Ensuite, toutes les souris seront soumises à un régime contrôle ou à un régime riche en anti-oxydant pendant 12 mois. Durant ces 12 mois de régime, les souris seront suivies par échographie ou élastographie, qui sont des techniques non invasives permettant de voir l'évolution du développement des nodules hépatiques et de la fibrose.

Nous serons très attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. En effet, tout au long de cette étude, nous serons attentifs à respecter la règle des 3R:

Remplacer: 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. Pour cela, nous suivrons de près les publications scientifiques sur le sujet.

Réduire: 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. L'utilisation d'un système d'imagerie permet de réduire de manière importante le nombre d'animaux utilisés.

Raffiner: 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. Ici, l'utilisation de l'imagerie nous permettra de suivre de manière longitudinale le développement de nodules et donc d'éviter toute souffrance de l'animal dû à un développement trop important. Des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale.

Actuellement, il n'existe pas de technique permettant de remplacer l'expérimentation animale pour étudier le développement de ces nodules qui est le résultat d'interactions complexes entre le nodule, son tissu d'origine et son environnement.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre le rôle de cette protéine d'intérêt hépatique et myéloïdique dans le développement de l'inflammation et du carcinome hépatocellulaire.

**20333** Les affections de l'appareil digestif sont nombreuses et très fréquentes chez les lagomorphes. Toutes sortes de stress, y compris alimentaire, favorisent le développement de ces affections, dont beaucoup se révèlent mortelles en l'absence de soins. Même s'il est difficile de chiffrer précisément la prévalence de la pathologie digestive en élevage rationnel en France à ce jour, une étude réalisée à partir de résultats d'autopsies sur la période 1994 - 1998, a estimé que 49 % des mortalités de lapins issus d'élevages industriels étaient imputables au moins en partie à une pathologie digestive. L'objectif de ce projet est de tester plusieurs stratégies de différentes natures permettant d'améliorer la survie des lapins face à ces maladies, telles que l'incorporation d'additifs, de matières premières ou d'autres traitements, mais aussi de mettre en application différentes techniques d'élevage, comme le rationnement alimentaire.

Les animaux seront placés en logements collectifs qui respectent la réglementation de l'expérimentation animale. Des chainettes seront disposées dans chaque logement, afin que les animaux puissent jouer avec quand ils le souhaitent.

L'état de santé des animaux sera vérifié quotidiennement par les techniciens animaliers de l'établissement utilisateur. Si un lapin présente des signes de stress ou de douleur comme une perte d'appétit ou des difficultés à se déplacer, il sera écarté de l'étude. Des points limites stricts et définis à l'avance sont appliqués tout au long du projet. Pour chaque acte pouvant engendrer une souffrance ou un stress (par exemple, les prélèvements de sang), le nombre d'animaux sera réduit au minimum permettant la démonstration d'un effet du traitement. La complexité des paramètres influant sur les besoins nutritionnels et leurs interactions ne permet pas d'une part d'utiliser uniquement des modèles alternatifs (modélisation, méthodes *in vitro*). D'autre part, la réponse à un régime alimentaire (digestion, absorption, utilisation, ...) est spécifique à chaque espèce. Les données de ce projet étant destinées à la filière cunicole, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur des lapins en engraissement.

Ce projet sera réalisé sur des lapins, puisque ce sont eux qui sont sensibles à ces maladies. Le projet aura une durée totale de 5 ans.

Les critères retenus pour discriminer les différentes solutions sont la survie et l'état sanitaire. Le poids des animaux, leur Gain Moyen Quotidien, leur consommation et l'indice de consommation sont également des critères enregistrés et analysés.

Un grand nombre d'animaux doivent être mis en essai afin de pouvoir discriminer les différentes solutions mises en œuvre, puisqu'un grand nombre d'animaux sont sains à la fin de l'essai. Un essai

comprendra 630 lapins au total, 3 essais par année pourront être réalisés, ce qui représente un total de 9450 lapins inclus dans le projet.

Dans un même essai, 9 traitements pourront être comparés ; cela permet de réduire le nombre d'essais devant être mis en place dans le projet (et donc le nombre d'animaux concernés au total), tout en obtenant des résultats fiables permettant de conclure quant à l'efficacité des solutions testées.

**20334** La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire caractérisée par une anomalie de l'hémoglobine, composant essentiel des globules rouges, permettant le transport de l'oxygène dans le sang. Les globules rouges sont déformés et prennent une forme de faucille. Ils ont, alors, des difficultés à circuler et peuvent occasionner des caillots dans les vaisseaux, à l'origine de nombreuses complications et douleurs. La rate étant atteinte, les sujets drépanocytaires sont également plus sensibles aux infections, qui peuvent être sévères. Les patients atteints de drépanocytose héréditaire peuvent souffrir du syndrome d'hyperhémolyse soudaine (HS). La HS définit une hémolyse accélérée des globules rouges caractérisée par une anémie sévère et des dommages tissulaires. La physiopathologie de ce syndrome est inconnue.

Dans le cadre d'une recherche sur un modèle murin exprimant cette pathologie, nous devons pratiquer une décontamination par transfert d'embryons afin d'obtenir des animaux sains sanitaires, indemnes de pathogènes et d'opportunistes spécifiques.

Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés à la pathologie drépanocytaire. Des méthodes alternatives (ex : *in vitro* ou *ex vivo*) ne sont pas réalisables pour ce projet. Le développement embryonnaire jusqu'au terme n'est pas réalisable *in-vitro* et ne peut se faire qu'à l'aide d'animaux de même espèce. L'utilisation d'animaux est donc rendue nécessaire.

Il sera utilisée 12 souris (4 mâles et 8 femelles) génétiquement altérées pour la drépanocytose héréditaire. Le nombre d'animaux est calculé selon le protocole expérimental de manière à obtenir un nombre suffisant d'embryons.

Le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3Rs. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, aliment spécifique et mise à mort dans les cas les plus graves).

Ce projet est classé en degré modéré.

**20335** La drépanocytose est une maladie génétique héréditaire caractérisée par une anomalie de l'hémoglobine, composant essentiel des globules rouges, permettant le transport de l'oxygène dans le sang. Les globules rouges sont déformés et prennent une forme de faucille. Ils ont, alors, des difficultés à circuler et peuvent occasionner des caillots dans les vaisseaux, à l'origine de nombreuses complications et douleurs. La rate étant atteinte, les sujets drépanocytaires sont également plus sensibles aux infections, qui peuvent être sévères. Les patients atteints de drépanocytose héréditaire peuvent souffrir du syndrome d'hyperhémolyse soudaine (HS). La HS définit une hémolyse accélérée des globules rouges caractérisée par une anémie sévère et des dommages tissulaires. La physiopathologie de ce syndrome est inconnue.

Dans le cadre d'une recherche sur un modèle murin exprimant cette pathologie, nous devons pratiquer une décontamination par transfert d'embryons afin d'obtenir des animaux sains sanitaires, indemnes de pathogènes et d'opportunistes spécifiques. Les modèles murins jouent un rôle clé pour comprendre les mécanismes associés à la pathologie drépanocytaire. Des méthodes alternatives (ex : *in vitro* ou *ex vivo*) ne sont pas réalisables pour ce projet. Le

développement embryonnaire jusqu'au terme n'est pas réalisable in-vitro et ne peut se faire qu'à l'aide d'animaux de même espèce. L'utilisation d'animaux est donc rendue nécessaire.

Il est estimé que 12 souris (6 mâles et 6 femelles) seront obtenues afin de fournir des modèles génétiquement altérés pour la drépanocytose héréditaire. Le nombre d'animaux est estimé selon le protocole expérimental de manière à obtenir un nombre suffisant de reproducteurs pour établir une colonie de souris modèles de la pathologie.

Le bien-être des animaux sera respecté tout au long du projet, répondant ainsi au besoin de raffinement décrit dans la règle des 3Rs. Pour satisfaire au raffinement, l'hébergement des animaux sera réalisé dans des locaux appropriés, avec un enrichissement systématique des cages, et un personnel habilité qui réalisera les différentes procédures en respectant les règles d'éthiques, le bien-être animal et le principe des 3R. Nos surveillances régulières nous permettront d'identifier d'éventuelles souris souffrantes et de prendre les mesures nécessaires (surveillance accrue, aliment spécifique et mise à mort dans les cas les plus graves).

Ce projet est classé en degré modéré.

**20336** Le surpoids et l'obésité sont des conditions qui concernent de nos jours une partie de plus en plus importante de la population humaine dans nos sociétés occidentales. Nos animaux de compagnie qui partagent nos vies sont également concernés. La stérilisation fréquente des chiens et chats de compagnie aggrave encore le phénomène puisque celle-ci favorise la prise de poids. Des aliments "de régime" ont été formulés pour aider nos chiens et nos chats à maintenir un poids satisfaisant, mais il est souvent difficile pour les propriétaires de rationner leurs animaux, certains ayant un seuil de satiété très élevé. Le fait de remplir l'estomac, au moment du repas, avec une substance expansive, mais peu/pas calorique pourrait permettre de générer chez l'animal une sensation de satiété tout en limitant l'apport calorique, et aider à la perte de poids et/ou au maintien d'un poids de forme.

Avant d'envisager une mise sur le marché vétérinaire d'un tel produit, il apparaît nécessaire de vérifier son efficacité et son innocuité. Ce projet, préparatoire d'une étude d'efficacité, a pour objectif de valider une méthodologie de suivi non-invasif du volume gastrique, ne requérant pas d'anesthésie générale. Un chien subira des clichés radiographiques abdominaux après prise orale d'un produit de contraste, et de l'agent rassasiant ou non.

Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3R.

Remplacement : des études préparatoires *in vitro* et chez le petit animal ont été effectuées avec l'agent rassasiant. Néanmoins, l'espèce ciblée étant le chien, et le mode d'action de ce produit étant dépendant des systèmes de régulation de la satiété, la validation de son efficacité ne peut se faire qu'*in vivo* chez le chien. Le présent projet ayant pour but de valider une méthode d'évaluation du volume gastrique en vue de la future étude d'efficacité, il ne peut également se faire que chez le chien.

Réduction : s'agissant d'un projet de validation méthodologique préalable à un autre projet qui répondra à la question de l'efficacité de l'agent rassasiant, un seul chien sera suffisant dans ce contexte.

Raffinement : les examens radiographiques seront réalisés sur chien vigile (examen non douloureux et très peu contraignant pour l'animal), mais une attention particulière sera portée au fait de réduire le stress associé à ces examens par la voix, les caresses et des récompenses. Une vigilance accrue à l'état clinique de l'animal sera portée après administration de l'agent rassasiant, afin de veiller à ce que l'augmentation du volume gastrique ne soit pas associée à des signes cliniques tels que nausées ou vomissements. Enfin, le chien inclus dans ce projet sera hébergé avec des congénères, il aura à sa disposition un lieu de couchage, une plateforme, des jouets, et bénéficiera d'une sortie quotidienne dans des espaces de détente extérieur et intérieur.

**20337** Chaque étude de ce projet a pour objectif principal d'évaluer les effets neuro-comportementaux d'un candidat médicament et consiste en différents tests d'observations comportementales (FOB) permettant d'évaluer l'état physique et le comportement général de l'animal, différents réflexes neurologiques ainsi que la température corporelle suite à l'administration du produit à tester. Ces observations sont répétées dans le temps (de quelques heures à plusieurs jours, période suffisante pour caractériser la cinétique d'effet du produit). Ces observations sont réalisées chez le chien lorsque cette espèce est utilisée au cours du développement préclinique de cette molécule (pharmacocinétique).

Un maximum de 150 chiens seront utilisés pour ce projet.

Remplacement : Dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets neuro-comportementaux. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est une des espèces de non-rongeurs adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux 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. D'autre part, les animaux peuvent être utilisés à plusieurs reprises pour tester différentes doses du candidat médicament ou différentes molécules.

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi d'éventuel signes cliniques
- la détermination des points limite
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- la familiarisation des animaux aux procédures
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux

**20338** L'infection par *Chlamydia trachomatis* est la première maladie sexuellement transmissible d'origine bactérienne. Dans la majorité des cas l'infection est asymptomatique. Chez certaines patientes, elle prend une forme chronique conduisant à des maladies inflammatoires pelviennes, qui peuvent causer une stérilité ou des grossesses extra-utérines. Les mécanismes sous-jacents à l'infection sont encore mal connus, en particulier les réponses immunes natives et adaptatives à l'infection, ainsi que la façon dont les bactéries parviennent à persister dans l'individu en dépit de ces réponses.

L'espèce *Chlamydia muridarum*, adaptée à la souris, reproduit en partie la physiopathologie de l'infection observée chez la femme. Une méthode d'infection trans-cervicale (au-delà du col) permet aussi d'étudier l'inflammation résultant de souches adaptées à l'homme (*Chlamydia trachomatis*) dans le modèle murin.

Dans ce projet, deux procédures seront mises en œuvre. Nous avons récemment observé que l'infection par *Chlamydia* provoque une sensibilité accrue à l'inhibition des histone demethylases, ce qui contribue à moduler la réponse transcriptionnelle de l'hôte à l'infection. Un inhibiteur de demethylase d'histone (JIB-04) a déjà été testé dans un modèle souris de croissance de tumeur (xenogreffes). Donc, la première procédure va tester l'effet de cet inhibiteur sur la capacité des souris à contrôler l'infection par *C. muridarum*, et sur la pathologie. Dans le cadre d'un projet financé par l'ANR, d'autres molécules agissant sur l'épigénome seront identifiées, dont certaines pourraient être testées dans un modèle murin. Un axe du projet consiste à étudier l'implication de certaines voies de signalisations spécifiques mises en place dans les tissus murins pour détecter et répondre à l'infection. Ce volet nécessite l'utilisation d'animaux transgéniques déficients pour une voie de signalisation particulière.

La seconde procédure consiste à regarder l'effet d'une immunisation par vaccin à ARN sur la résolution de l'infection par *C. trachomatis* dans un modèle murin. Nous avons identifié certaines protéines de *Chlamydia* qui pourraient être de bonnes cibles vaccinales, et nous prévoyons de faire

des essais préliminaires dans un modèle murin à petite échelle. Dans ce contexte, des souches OGM de Chlamydia KO pour un gène particulier pourront être utilisées dans le modèle d'infection.

Pour les deux procédures, les animaux utilisés sont des femelles uniquement, puisqu'il s'agit d'étudier l'infection par *C. trachomatis* dans le tractus génital féminin. Des souris de 6-7 semaines seront utilisées. A ce stade les animaux ont atteint leur maturité sexuelle. Pour chaque point expérimental nous utiliserons le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs d'un point de vue statistique. Les animaux seront élevés en groupe, avec un équipement et des conditions sanitaires adéquates. Les animaux seront sacrifiés une à 3-4 semaines après infection, suivant le but de l'expérience. Les protocoles d'infections ont déjà été utilisés chez les souris et ne donnent pas lieu à des manifestations de gêne chez les animaux. Le degré de sévérité pour les animaux infectés était léger, avec une inflammation au niveau du tractus génital induite par l'infection. L'utilisation d'antibiotique ou d'anti-inflammatoire n'est pas possible car cela modifierait justement le processus infectieux étudié. Pour la procédure 1, l'administration de molécules JIB-04 ne devrait pas augmenter le degré de sévérité, cette molécule a déjà été administrée pendant plus de 30 jours à des souris avec un effet bénéfique sur un modèle de survie à un cancer. Pour la procédure 2, l'administration de vaccin ne devrait pas augmenter le degré de sévérité non plus, c'est au contraire un bénéfice contre l'infection qui est attendu pour certains candidats.

Le nombre total d'animaux utilisé va dépendre du nombre de candidats vaccins que nous obtiendrons à tester, il ne dépassera pas 1000 animaux sur l'ensemble des volets du projet (procédure 1 : 152 souris, procédure 2 : 848 souris).

Ces expériences sont mises en place après un important travail de tests sur des modèles cellulaires pour limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. D'autre part, plusieurs candidats vaccins seront testés en parallèle pour minimiser le nombre d'animaux requis pour atteindre une signification statistique. Les animaux seront anesthésiés avant toute manipulation invasive.

Le bénéfice attendu est une identification de facteurs de l'hôte qui restreignent ou au contraire facilitent la progression de l'infection, et la mise en place d'une réponse immune. A l'issue de ce projet, et selon les résultats, d'autres études pourront être mises en place pour comprendre comment l'infection par *C. trachomatis* peut résulter en une infection chronique, et les processus menant à des lésions tissulaires. Le but ultime est de développer des stratégies thérapeutiques pour empêcher ces processus chez les humains.

**20339** La bactérie *Helicobacter pylori* infecte l'estomac de la moitié de la population humaine mondiale. Cette infection peut atteindre jusqu'à 90% de la population dans les pays en voie de développement. Dans les pays industrialisés, entre 20 et 40% des adultes sont infectés chroniquement. Après acquisition de la bactérie durant l'enfance, l'infection par *H. pylori* devient chronique et persiste plusieurs dizaines d'années voire toute la vie. Bien que cette infection provoque toujours une gastrite chronique, elle est asymptomatique dans la grande majorité des cas. Parmi les personnes infectées, environ 10% développeront un ulcère gastrique ou duodénal. L'infection par *H. pylori* est également à l'origine de pathologies plus sévères comme l'adénocarcinome gastrique qui touche entre 1 à 3% des personnes infectées ou le lymphome gastrique du MALT dont l'incidence est d'environ 0,3%. *H. pylori* a été classée par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer comme carcinogène de classe I, c'est à dire directement associée au développement du cancer gastrique chez l'homme. On estime que l'infection par *H. pylori* est responsable de 60 à 90 % des cas de cancers gastriques et qu'elle cause le décès de près de 800 000 personnes dans le monde chaque année.

La relation entre l'infection par *H. pylori* et le développement de lésions cancéreuses gastriques a pu être mise en évidence d'une part par des études épidémiologiques mais aussi en grande partie par le développement de modèles animaux, en particulier souris et gerbille. L'établissement de ces modèles dans de nombreux laboratoires et dans notre groupe de recherche a constitué une contribution majeure à la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine du développement de lésions cancéreuses gastriques dues à l'infection par *H. pylori*. Cependant, ces mécanismes sont encore très partiellement compris. Dans notre laboratoire, nous cherchons à



mieux comprendre comment *H. pylori* est capable d'établir une infection gastrique persistante et comment cette infection chronique conduit à des pathologies aussi graves que le cancer gastrique. Pour ces études, nous utilisons le modèle d'infection de la souris par *H. pylori*. En analysant la capacité de colonisation de souches de *H. pylori* mutantes construites au laboratoire, nous cherchons tout d'abord à identifier les facteurs de la bactérie qui sont importants pour sa capacité de colonisation, sa virulence et son effet pro oncogène. De plus, afin de caractériser de nouvelles molécules ayant des activités anti-*H. pylori*, nous testons leur effet sur la colonisation de la muqueuse gastrique dans ces modèles animaux d'infection par *H. pylori*. Plusieurs de ces molécules ont déjà apporté des résultats encourageants dans des expériences préliminaires. Ces molécules sont de bons candidats pour l'éradication de l'infection dans la population humaine. Ce type d'étude soulève de plus en plus d'intérêt du fait d'une forte incidence de souches de *H. pylori* résistantes aux antibiotiques couramment utilisés. Nos recherches sont donc susceptibles d'ouvrir la voie vers la mise au point de nouveaux traitements alternatifs contre l'infection par *H. pylori*. Le modèle de colonisation de la souris par *H. pylori* est parfaitement adapté à nos questions scientifiques sur l'étude de la réponse de la souris à l'infection gastrique par des souches de *H. pylori* et sur l'analyse de l'effet de l'administration de diverses molécules sur la colonisation gastrique de la souris par *H. pylori*.

Il existe des modèles de culture de cellules gastriques que nous utilisons *in vitro* mais qui ne peuvent en aucun cas permettre d'analyser la colonisation gastrique par *H. pylori*. De plus, cette bactérie a la capacité d'établir une infection chronique sur des décennies grâce à ses propriétés d'adaptation aux conditions hostiles de l'environnement gastrique ainsi qu'à sa faculté à développer des mécanismes lui permettant d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Dans ce projet, nous utiliserons le modèle d'infection de la souris par *H. pylori* avec deux procédures, chacune de ces procédures représente un degré de sévérité léger. Les souris seront surveillées de façon à identifier l'apparition de points limites préétablis, et intervenir rapidement dès qu'ils sont atteints.

Nous utiliserons un total de 1540 souris, nombre qui devrait être nécessaire et suffisant pour conclure comme établi avec l'aide de nos collègues biostatisticiens.

Actuellement il n'y a que le modèle *in vivo* chez l'animal qui permette d'être le plus proche de ce qui se passe dans un estomac humain.

**20340** En France, aujourd'hui, près de 17 % de la population présente un foie trop gras. Parmi ces personnes, 2,6 % sont atteintes de fibrose hépatique avancée pouvant évoluer en cirrhose et en cancer. Cela représente 200 000 personnes en France, avec un nombre de décès d'environ 15 000 par an.

Chez un patient atteint d'une maladie du foie, un tissu cicatriciel remplace les cellules hépatiques endommagées : c'est la fibrose hépatique. Si l'agression est répétée ou continue comme cela se produit dans le cas d'une hépatite chronique, les cellules du foie, tenteront de se réparer, mais leurs nombreuses tentatives entraîneront la formation de ce tissu cicatriciel sans fonction utile pour l'organe. Ce tissu peut interférer et entraver le flux sanguin vers et à l'intérieur du foie, ce qui limite l'approvisionnement en sang pour les cellules hépatiques.

Selon l'ampleur des dommages subis par le foie, la fibrose peut-être plus ou moins importante, et l'on distingue plusieurs stades : fibrose légère (F1), modérée (F2) et sévère (F3). A partir du stade F4, lorsqu'il existe dans tout le foie une quantité exagérée de tissu cicatriciel, on parle de cirrhose.

La fibrose hépatique en elle-même ne provoque pas de symptômes. Elle est réversible si la cause de la maladie est traitée et si les lésions ne sont pas trop sévères. Le foie peut alors retrouver une structure normale. Mais après des mois ou des années d'agressions chroniques ou répétées, la fibrose devient permanente. Il est donc primordial de connaître le niveau de fibrose de son foie afin d'établir un diagnostic, d'envisager un traitement adapté, et d'assurer le suivi de ce traitement et de son efficacité. La biopsie hépatique demeure l'examen de référence indispensable dans la majorité des cas mais cela n'est pas dénué de risques pour le patient. Les traitements responsables d'une régression de la fibrose sont quant à eux généralement trop toxiques pour une utilisation à long

terme ou n'ont pas d'efficacité prouvée. Il est donc nécessaire d'évaluer de nouveaux traitements anti-fibrosants permettant de traiter la fibrose hépatique avant l'atteinte d'un stade trop sévère.

Le but de ce projet est d'induire une fibrose hépatique modérée chez le rat par une pré-sensibilisation au phénobarbital suivie de l'induction avec des doses progressivement croissantes de tétrachlorure de carbone (CCl<sub>4</sub>) avant de transférer les animaux chez un client de l'industrie pharmaceutique pour qu'il réalise l'évaluation de nouveaux traitements sur cette pathologie avec des composés sélectionnés sur des modèles cellulaires.

Ce projet nécessitera l'utilisation de 132 rats mâles Sprague-Dawley répartis en 2 groupes expérimentaux, 1 groupe de 12 rats non induits et 1 groupe de 120 rats induits, qui seront soumis aux 2 procédures expérimentales suivantes :

1) Induction de la fibrose hépatique sur le groupe de 120 rats, placés à 2 par cage, par administration via l'eau de boisson pendant 2 semaines de phénobarbital à la dose de 0,35 g/l pour la phase de pré-sensibilisation, suivie par le gavage 2 fois par semaine pendant 7 semaines de CCl<sub>4</sub> mis en solution dans de l'huile d'olive avec des doses progressivement croissantes de 0,1 ml/kg à 0,85 ml/kg pour l'induction de la fibrose hépatique, avec un volume d'administration de 2 ml/kg.

Le groupe de 12 rats non induits, placés à 2 par cage, recevra uniquement de l'eau de boisson pendant les 2 semaines de pré-sensibilisation puis de l'huile d'olive pendant les 7 semaines de la phase d'induction, avec un volume d'administration de 2 ml/kg.

Un suivi de la prise alimentaire sera effectué 2 fois par semaine pour l'ensemble des cages d'animaux induits et non induits.

2) Transfert de l'ensemble des animaux induits et non induits en 3 fois à une semaine d'intervalle par transporteur spécial chez notre client : les animaux seront placés dans des cages de transport spécialement conçues à cet effet (50 x 30 x 20 cm), à 2 par cage, avec de la litière et de l'aliment à disposition, des briques d'Aspen, et dans des conditions de température et d'humidité identiques à celles de leur hébergement. Ils seront pris en charge le matin et seront livrés à notre client le jour-même, en début d'après-midi.

Les animaux seront hébergés dans nos locaux à 2 par cage (48 x 27 x 20 cm), en cycle de lumière inversé pour respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des briques d'Aspen seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas encore de modèles *in vitro* permettant l'évaluation de l'efficacité de composés sur la fibrose hépatique (Remplacement) et nous utiliserons le nombre minimum d'animaux défini par notre client mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives selon son expérience de ce modèle dans les conditions expérimentales qu'il a définies (Réduction).

Des observations quotidiennes des animaux seront effectuées tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré 2 fois par semaine et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 15% entre 2 pesées ou de plus de 20% du poids maximum atteint au cours de l'étude, manque de toilettage ou inversement toilettage excessif, poil ébouriffé, écoulement nasal ou oculaire, absence de mobilité, problème de motricité, vocalisation, posture voutée, prise alimentaire nulle) entraînera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

A terme, ces travaux pourraient ouvrir de nouvelles voies de traitement de certaines formes de maladies hépatiques, besoin médical qui est aujourd'hui clairement établi.

**20341** Le déficit en enzyme (=protéine) : lipase acide lysosomale (LAL) est une maladie héréditaire causée par des mutations dans le gène LIPA. Elle induit une accumulation de gras (=lipides) au niveau des organes, notamment dans le foie. La gravité de l'affection dépend de la quantité d'enzymes. La forme la plus sévère de la maladie (maladie de Wolman), absence totale de l'enzyme (<2% d'enzymes), concerne 1 nourrisson sur 300 000 naissances et entraîne une mort précoce à l'âge de 3-8 mois, tandis que dans sa forme la moins sévère (maladie du stockage des esters de cholestérol, CESD), les patients ne présentent peu de symptômes visibles. Le seul traitement de référence consiste en une injection hebdomadaire dans le système sanguin de l'enzyme LAL. Ce

traitement non curatif reste coûteux. De plus, son efficacité et ses effets secondaires sont encore en cours d'évaluation.

Au vu des succès de la thérapie génique, l'addition du gène LIPA sain dans les cellules du foie de patient pourrait être un traitement à long terme. En effet, les cellules modifiées produiront l'enzyme manquante dans l'organe le plus affecté et donc préviendront l'accumulation de lipides liée à la maladie. D'autant plus qu'une légère hausse du taux d'enzymes (>2%) suffirait à réduire considérablement les symptômes. Pour ce projet, nous utiliserons différents virus adéno-associé (AAV) modifiés pour apporter le gène manquant de l'enzyme LAL (AAV-LAL) au niveau des cellules du foie, cible privilégiée de nos virus.

Plusieurs vecteurs de thérapie génique exprimant la LAL ont été testés *in vitro* sur des cellules de foie et de peau de patient et ont montrés une bonne expression de l'enzyme ainsi qu'une diminution des lipides dans les cellules de patients. Pour étudier l'effet thérapeutique sur l'ensemble des organes, nous devons procéder à des études *in vivo* sur un modèle animal déficient en lipase acide lysosomale (LAL  $-/-$ ). Ce modèle reproduit les symptômes induit par de la déficience en LAL humaine : accumulation de lipide dans le foie et permet d'étudier l'effet corrective de notre approche de thérapie génique. Ces souris seront injectées avec les vecteurs AAV-LAL, nous suivrons la biodistribution du vecteur, la production de l'enzyme ainsi que l'effet du traitement sur l'accumulation de lipides dans tous les organes.

Néanmoins, en tenant compte de notre stratégie de reproduction préférentielle de ces souris à savoir : souris hétérozygotes non-malade (LAL +/-) entre elles, seulement 1 animal sur 4 sera affecté par la déficience en LAL à la naissance. Pour réduire le nombre d'animaux malade à élever et à utiliser, nous allons procéder par étape : sélection des meilleurs vecteurs AAV-LAL *in vivo* sur souris saines (24 vecteurs), puis études de ces vecteurs sur souris LAL  $-/-$  (15 vecteurs) et enfin étude de la dose thérapeutique à injecter pour aboutir à la sélection du meilleur AAV-LAL « médicament » capable de réduire l'accumulation de lipides. Afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser, un premier criblage des vecteurs a été réalisé *in vitro*. Nous avons remplacé autant que possible le test des vecteurs AAV-LAL *in vivo* par des tests *in vitro* sur des cellules de foie et de peau de patient et ainsi diminuer le nombre de constructions à tester (24 contre 60 constructions initiales). Néanmoins, la maladie de Wolman affecte différents organes (foie, intestin, rate ...) et donc nécessite d'étudier l'effet thérapeutique : biodistribution de l'enzyme et diminution du taux de lipides sur un organisme animal. Afin de raffiner nos procédures, nous avons mis en place un suivi adapté des souris LAL  $-/-$  (pesés des animaux, au besoin aliment placé au sol et maintien du lien social) et des points limites les plus précoces possibles afin de soulager ou supprimer toutes souffrances. De plus, les procédures expérimentales potentiellement douloureuses (prélèvement sanguin) seront effectuées sous anesthésie gazeuse (Isoflurane).

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 4 souris par groupe pour l'étude sur les souris saines et 8 souris par groupe pour les souris malades, par une étude statistique prédictive (test de comparaison quantitative de groupes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 5 ans et nécessitera l'utilisation totale de 487 souris (100 souris WT, 75 souris LAL +/- et 312 souris LAL  $-/-$ ).

**20342** Les protéines membranaires de la surface des neurones, en particulier les récepteurs aux neurotransmetteurs, sont essentiels au développement et à la fonction du système nerveux. Du fait de leur très grande taille, les neurones synthétisent ces protéines par des mécanismes et des voies de trafic intracellulaire qui leurs sont spécifiques. Les neurones fabriquent ainsi certaines de leurs protéines en omettant des étapes de maturation considérées comme nécessaires dans d'autres types cellulaires. Ces processus sont importants dans le cadre de l'apprentissage et de la mémorisation et sont dérégulés dans nombre de pathologies humaines, notamment dans la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. Les mécanismes cellulaires sous-jacents sont encore mal compris.

Pour étudier ces processus, de nombreuses études ont été effectuées dans des modèles de culture cellulaire *in vitro* en utilisant des inhibiteurs spécifiques permettant de mimer l'omission d'étapes de

maturation des protéines de surface. Il a été ainsi établi que, contrairement au dogme, certaines de ces étapes ne sont pas nécessaires à la production de protéines neuronales fonctionnelles, et que ces inhibiteurs sont bien tolérés par les neurones. Il est maintenant essentiel d'étudier ces processus chez l'animal. L'objectif du projet est donc de caractériser comment la maturation des protéines membranaires neuronales influencent la fonction de leur protéine de surface et ainsi la morphologie des neurones et leurs connections fonctionnelles dans le cerveau. Pour ce faire, nous utiliserons des approches génétiques en injectant de façon ciblée des vecteurs d'expression de protéines d'intérêt dans le cerveau de souris transgéniques, le modèle de référence dans notre champ d'étude, pour bloquer certaines étapes de la maturation des protéines membranaires dans les neurones de circuits neuronaux spécifiques. Après plusieurs semaines d'expression de ces vecteurs, les animaux seront sacrifiés et utilisés pour des expériences post-mortem d'imagerie, de biochimie et d'enregistrements électrophysiologiques.

Nous utiliserons 457 souris sur 5 ans.

La règle des 3Rs sera implémentée comme-suit. Remplacement : ce projet se base sur de nombreuses études *in vitro* sur des cellules en culture et requiert maintenant l'utilisation de modèles animaux. Ces modèles sont indispensables pour étudier ces processus dans le cerveau, un environnement cellulaire complexe qui ne peut pas être modélisé de façon fiable *in vitro*. Réduction : pour réduire le nombre d'animaux, nous avons estimé la taille des échantillons par une étude rétrospective de la littérature et utiliserons des tests statistiques au fur et à mesure du projet pour ne pas utiliser plus d'animaux que nécessaire du point de vue mathématique. Raffinement : Nos études pilotes montrent que les procédures que nous utilisons sont bien tolérées et n'induisent pas de souffrance et de stress chez les animaux. Pour éviter toute souffrance, les procédures requises pour le projet se feront après analgésie sous anesthésie générale. Les animaux seront observés et manipulés régulièrement par un personnel qualifié afin de minimiser le stress et la douleur qui seront évalués à l'aide de points limites adaptés.

Ce projet apportera des données nouvelles sur la synthèse des protéines de surface dans les neurones, ouvrant de nouvelles voies pour étudier des processus dans des modèles pathologiques et, à terme, comprendre et traiter ces maladies.

**20343** Notre laboratoire cherche à traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies sont rares, progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. Le muscle privé de ses protéines structurales finit par se détruire puis l'apparition de fibrose rigidifie le tissu et entraîne de sévères complications. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible bien que des approches de thérapie génique sont en cours d'étude.

La thérapie génique, consistant à introduire un gène médicament dans l'organisme à l'aide d'un vecteur viral inoffensif, offre l'alternative la plus prometteuse pour traiter ces maladies. Cependant, elle doit être administrée le plus tôt possible chez le patient pour être vraiment efficace. La présence de fibrose empêche le vecteur viral de pénétrer correctement dans les tissus atteints réduisant ainsi son efficacité thérapeutique.

Récemment, il a été démontré que les cellules CAR-T (Chimeric Antigen Receptor- T cells), principalement utilisées dans le traitement des cancers sanguins, peuvent être génétiquement modifiées pour reconnaître les cellules composant la fibrose. Nous souhaitons donc modéliser une approche thérapeutique combinant des CAR-T anti-fibrotiques et des vecteurs viraux pour traiter les dystrophies musculaires. Pour cela nous utiliserons une approche par étape pour obtenir une preuve d'efficacité thérapeutique. Nous testerons d'abord l'effet des cellules CAR-T sur la fibrose des souris DBA-MDX qui sont rapidement atteintes par cette complication. Ensuite, nous combinerons les effets des CAR-T et de la thérapie génique d'abord chez ces souris puis dans divers modèles murins de dystrophies progressives (SGCA, SGCG, FKRP, TitineDeltaMex5) dans lesquels la fibrose apparaît à des niveaux divers. L'approche thérapeutique combinée CAR-T et

thérapie génique pourrait permettre de traiter plus efficacement les dystrophies musculaires surtout lorsque la maladie est déjà à un stade avancé.

Notre approche tient à respecter le principe des 3Rs :

**Remplacement** : L'étude de l'effet des CAR-T sur la réduction d'une fibrose musculaire ne peut s'effectuer qu'*in vivo* et nécessite donc d'un modèle animal capable de développer cet aspect de la pathologie. En effet, il n'existe pas de modèle *in vitro* de fibrose musculaire et l'interaction et l'élimination des cellules fibrotiques par les lymphocytes T nécessite un milieu physiologique où la réponse immunitaire peut avoir lieu.

**Raffinement** : Les modèles animaux choisis seront les plus pertinents en l'état des connaissances. Les souris seront hébergées par groupes expérimentaux de 6 dès leur réception. Nous privilégierons des prélèvements de sang à la veine sub-mandibulaire plutôt qu'au sinus rétro-orbitaire.

**Réduction** : le nombre d'animaux utilisés, d'un total de 261, a été estimé en fonction de nos connaissances et d'un calcul statistique. Ce nombre est réduit au minimum tout en conservant une puissance statistique nécessaire pour l'exploitation des données. De plus, notre projet se décompose en trois grandes étapes, l'étude pilote suivie de deux études et nous ne réaliserons l'étape 2 que si les résultats de l'étude pilote sont probants et l'étape 3 que si l'étape 2 a produit des résultats escomptés.

**20344** Le cancer est un problème de santé publique majeur, et la 2ème cause de mortalité dans le monde. Récemment, des traitements développés chez la souris visant à lever les phénomènes de tolérance immunitaire contre le cancer ont prouvés leur efficacité chez l'Homme et redonnés un espoir de réduire la mortalité liée à cette maladie. Ces traitements n'ont néanmoins pas encore permis d'éradiquer la maladie. Ce projet permettra d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et d'améliorer les immunothérapies visant à inhiber la tolérance immunitaire aux tumeurs et augmenter l'efficacité des vaccins contre le cancer.

Certaines molécules des cellules tumorales peuvent agir comme des signaux de danger pour le système immunitaire et activer une réponse visant à éliminer les tumeurs. Le rôle de ces signaux est cependant ambigu car ils peuvent stimuler des cellules protégeant la tumeur, comme des cellules tentant de l'éliminer. Ils sont donc capables de modifier l'évolution de la tumeur et des réponses immunitaires anti tumorales. Notre projet de 5 ans vise à déterminer le rôle précis d'un récepteur de signal de danger dans les réponses immunitaires anti-tumorales dans un modèle de mélanome chez la souris. Pour cela nous utiliserons des modèles de souris conditionnellement déficientes pour ce récepteur et nous leur injecterons des cellules tumorales suivi ou non de transfert adoptif de lymphocytes T protégeant ou attaquant la tumeur et nous étudierons la pousse tumorale, le phénotype des cellules immunitaires recrutées au sein de la tumeur et des ganglions drainants. Enfin nous évaluerons l'influence de traitements immunothérapeutiques dans ces modèles de souris. Les souris seront suivies quotidiennement jusqu'à l'observation d'une pousse tumorale seuil signant l'irréversibilité de la maladie. Pour réaliser ce projet dans le respect des 3R, nous utiliserons 2860 souris au total.

- En termes de remplacement, aucune alternative à l'utilisation d'un modèle murin n'étant disponible pour cette recherche, ces expériences chez la souris sont indispensables car les interactions complexes se déroulant *in situ* ne peuvent être modélisées *in vitro*. Mais pour les tests fonctionnels nous remplacerons chaque fois que possible l'utilisation des animaux par des tests *in vitro*.

- Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons établi des procédures expérimentales tenant compte de l'effectif minimal pour atteindre une puissance statistique suffisante. L'utilisation de techniques modernes de phénotypage et les tests *in vitro* développés par notre équipe permettra également de réduire le nombre de souris utilisées. 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.

- Dans un souci de raffinement, nous avons mis en place des points limites précis et un système de score afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux. Les animaux seront contrôlés régulièrement et scorés par du personnel formé et compétent afin de détecter les changements de poids d'aspect et l'apparition de comportements associés à la douleur. En cas de signes précoces d'ulcération tumorale ou de souffrance, les animaux recevront des antidouleurs, et s'ils présentent de l'hypothermie ou des difficultés à se nourrir, ils seront placés dans des cages chauffées ou en présence de nourriture humidifiée respectivement. Ils seront mis à mort si le diamètre tumoral dépasse une valeur seuil ou s'ils perdent une valeur seuil de leur poids. Les souris âgées de 7 à 15 semaines seront hébergées en groupe en accord avec la législation en vigueur avec un nombre maximum de 5 souris par cage dans un environnement enrichi (lanières de papier permettant la nidification) avec un accès illimité à la nourriture et l'eau de boisson au sein d'une animalerie A2 avec surveillance informatique du respect des paramètres environnementaux (température, hygrométrie).

**20345** Les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) de l'enfant et de l'adolescent sont des cancers pédiatriques rares, dont le pronostic s'est peu amélioré au cours des 25 dernières années. Les taux de rechute et de survie sont respectivement d'environ 45% et 65%. Le traitement standard comprend une polychimiothérapie, parfois associée à une greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) pour les patients de haut risque ou en rechute. La greffe de CSH est un traitement lourd, source de séquelles à long terme. Des progrès sont donc nécessaires pour réduire le taux de rechute, améliorer la survie et limiter les séquelles. L'objectif de nos études est de caractériser les mécanismes mis en jeu dans les leucémies (cancer des cellules sanguines) de l'enfant à mauvais pronostic. Pour cela nous identifions les gènes altérés par des mutations (oncogènes ou gènes suppresseur de tumeurs) dans les échantillons de patients atteints de leucémie puis nous exprimons ces mutations dans des cellules normales pour comprendre le rôle de ces mutations dans la transformation cancéreuse et tester de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Pour ce projet, nous réalisons des approches de cultures cellulaires *in vitro* et des approches de modélisation bioinformatique pour comprendre les conséquences de ces mutations. Les modèles murins sont incontournables car nous n'avons pas d'autre alternative pour étudier l'apparition et la progression des leucémies pédiatriques. En effet, 1) La génération et la maturation terminale de toutes les lignées hématopoïétiques à partir de cellules souches n'est actuellement pas possible par des techniques de culture *in vitro*, 2) Des lignées cellulaires immortalisées et poussant *in vitro* ne sont pas disponibles pour la plupart des oncogènes que nous étudions. D'autre part, plusieurs études montrent que ces lignées cellulaires cultivées *in vitro* divergent significativement des échantillons leucémiques de patients, 3) Les approches de culture *in vitro* ne permettent pas reproduire certaines caractéristiques des leucémies (ex : infiltration des cellules leucémiques dans le système nerveux). Comme certaines leucémies sont spécifiques de l'enfant, il est important de comprendre la spécificité des différents stades de développement sur l'apparition et le type des tumeurs *in vivo*, 4) Des modèles précliniques *in vivo* sont indispensables pour développer des composés pharmacologiques efficaces pour cette pathologie de très mauvais pronostic. Dans ce projet, nous injecterons des cellules de foie fœtal à différents stades de développement embryonnaire qui expriment les mutations dans le foie fœtal d'embryons receveurs. Nous travaillerons dans le respect de la règle des 3R. Réduire : Pour ce projet, nous utiliserons 630 animaux sur 3 ans, nombre minimal requis pour avoir des groupes significatifs, permettant l'obtention de résultats statistiquement exploitables sans avoir recours à une répétition des protocoles. Remplacer : le remplacement de l'expérimentation animale par d'autres méthodes est impossible ; en effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire *in vitro* la complexité physiologique des interactions cellulaires au sein d'un organe. Raffiner : les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. Tout animal qui présentera un des points limites d'arrêt de la procédure définis pour limiter la douleur ou la souffrance (traitements antalgiques pré- et post-opératoires, imagerie non invasive sous anesthésie) sera euthanasié. Une surveillance continue

des animaux sera effectuée afin de détecter tout éventuel signe de leucémie et des mesures pour les soulager seront prises comme des soins spécifiques et des adaptations alimentaires.

La totalité des animaux sera mise à mort à la fin des procédures selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever tous les échantillons tissulaires permettant une exploitation optimale des données tissulaires et cellulaires.

**20346** Notre projet « Rôle du tissu adipeux brun dans la dépense d'énergie dépendant des hormones thyroïdiennes chez la souris mâle adulte » est à finalité de recherche fondamentale.

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. Chez la souris les hormones thyroïdiennes peuvent agir soit dans le cerveau où elles stimulent des nerfs qui à leur tour stimulent les organes responsables de la dépense énergétique, soit directement dans ces organes 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, ce tissu produit des hormones thyroïdiennes, 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.

Des souris génétiquement modifiées pour invalider la signalisation des hormones thyroïdiennes uniquement dans le tissu adipeux brun, ont été obtenues. Ces souris ont une température corporelle normale mais ont besoin d'un apport alimentaire plus important lors d'une exposition au froid (4°C) pour maintenir leur température corporelle. D'autre part lorsqu'hébergés à 23°C, qui représente un petit stress thermique chez les souris, ces animaux génétiquement modifiés sont résistants à l'obésité lorsque nourris avec un régime riche en gras et en sucre, alors que des souris témoins deviennent obèses dans les mêmes conditions. Ces observations suggèrent que les souris mutantes dépensent plus d'énergie que des souris contrôles pour maintenir leur température corporelle, ce qui nécessite qu'elles aient une prise alimentaire plus forte, et qui limite leur prise de poids. A une température d'animalerie de 30°C, température à laquelle les souris n'ont pas besoin de produire de chaleur pour maintenir leur température corporelle, les mêmes souris mutantes deviennent aussi sensibles à l'obésité que les souris contrôles. L'ensemble des résultats suggèrent que l'absence de signalisation thyroïdienne dans le tissu adipeux brun, entraîne une dépense énergétique accrue à 23°C mais pas à 30° qui représente la thermoneutralité. Afin de tester cette hypothèse, le but de ce projet est de mesurer directement la dépense énergétique chez ces souris mutantes aux deux températures.

Bénéfices escomptés : Ce projet permettra d'établir s'il existe un effet direct des hormones thyroïdiennes dans le tissu adipeux brun qui stimule la dépense d'énergie. A moyen terme, ce résultat serait d'importance en particulier dans le cadre de la lutte contre l'obésité. Les hormones elles même ne peuvent être utilisées à cette fin, à cause de leur effets indésirables sur d'autres tissus. Des analogues qui ciblent le tissu adipeux brun, comme il en existe ciblant le foie, pourraient constituer une nouvelle possibilité thérapeutique à tester.

Pour cette étude, l'invalidation de la signalisation thyroïdienne dans le tissu adipeux brun sera obtenue par injection intrapéritonéale quotidienne d'un composé nécessaire à l'obtention de la mutation chez l'adulte. La dépense d'énergie sera ensuite évaluée sur les mêmes souris à deux températures 23° puis 30°C, dans un système qui permet non seulement de mesurer la consommation d'oxygène, mais aussi l'activité spontanée, ainsi que les prises alimentaires et hydriques. Chaque mesure de dépense énergétique nécessite que l'animal soit isolé dans le système de mesure pendant trois jours. Il est remis avec ses congénères entre les deux mesures.

Remplacement : Aucun modèle *in vitro* ne peut se substituer au modèle animal 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.

Raffinement : Un suivi adapté 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. Une période de récupération est prévue entre les différentes interventions pour limiter la souffrance des animaux. Le maintien en groupes sociaux, le transfert de litière quand l'animal doit être isolé et l'utilisation d'analgésiques et d'anesthésiques avant le prélèvement sanguin terminal permettent aussi d'éviter le stress et de limiter tout risque de souffrance. Un enrichissement des cages lorsque les animaux sont rassemblés évite les bagarres. Le projet se déroule sur plusieurs animaleries, le transport se fera dans des cages permettant de conserver le confinement, selon les conditions réglementaires

Réduction : 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 16 souris. A l'issue de l'expérimentation l'ensemble des animaux sont mis à mort pour échantillonner les différents tissus d'intérêt. L'unique procédure est classée d'un degré sévère.

**20347** Il y a 40 ans, le mot "stress" commençait à peine à être connu. Maintenant, c'est une réalité que nombreux considèrent comme un problème normal de la vie moderne. Le stress est le lot quotidien d'une majorité de personnes dans leur travail, mais il atteint également les enfants, les adolescents et les personnes âgées. Selon l'American Institute of Stress, ce problème est à l'origine de 75 à 90% des nouvelles consultations médicales et de 60 à 80% des accidents de travail. Les coûts du stress se manifestent sous forme d'absentéisme, de perte de productivité, de rotation de personnel, d'accidents, de frais médicaux et légaux directs ainsi que d'assurances et de compensations. Cette situation s'aggrave d'année en année et la situation pandémique telle que celle vécue au cours de l'année 2020 a accéléré celle-ci et a touché de nouvelles catégories de personnes.

Dans le cas de stress aigu, les traitements médicamenteux permettent de reprendre le contrôle de la situation. Dans le cas de stress chronique, différents traitements médicamenteux peuvent être prescrits mais l'indication de ces traitements n'est pas toujours prioritairement l'effet anti-stress et ils ne sont pas dénués d'effets secondaires.

Il existe des produits d'origine naturelle présentant moins d'effets secondaires et pouvant être utiles pour le traitement aigu du stress et de l'anxiété. Ces produits sont particulièrement utiles lors de troubles passagers ou de faible intensité. Toutefois, ce sont généralement des mélanges complexes aux mécanismes d'action mal identifiés. C'est pourquoi le contrôle de l'efficacité de différents lots ne peut généralement pas être réalisé par une méthode analytique et nécessite une validation *in vivo*.

Depuis de nombreuses années, les lots de production d'un produit de ce type sont évalués à l'aide du test de l'enfouissement défensif (EDC) chez le rat. Dans ce test, le rat reçoit un choc électrique de faible intensité qui va déclencher une réponse comportementale d'enfouissement qui consiste à recouvrir l'électrode avec la litière disposée sur le sol. L'objectif du projet est de remplacer, pour des raisons éthiques, l'EDC par le labyrinthe en croix surélevé (LCS) pour la réalisation de ces contrôles de production. En effet, dans le LCS, l'animal ne reçoit pas de choc électrique. De plus, l'anxiété est générée par la présence d'un espace ouvert que l'animal peut éviter totalement en restant dans un espace fermé et rassurant. Ainsi, seuls les rats à l'anxiété réduite explorent l'espace ouvert. Le LCS est une procédure de sévérité légère alors que l'EDC est une procédure de sévérité moyenne.

Le présent projet vise à valider et optimiser les conditions d'utilisation du LCS pour évaluer les effets anxiolytiques de ce produit d'origine naturel spécifique, permettant de changer de test, mais également de réduire le nombre d'animaux nécessaire à chaque test à l'avenir.

Le modèle rat est utilisé régulièrement par l'industrie pharmaceutique pour évaluer l'efficacité de produits contre le stress et l'anxiété et est validé et reconnu par la communauté scientifique travaillant sur les tests comportementaux.



Dans ce projet, 324 rats seront utilisés en 3 études sur 8 mois pour optimiser le test. L'étude 1 (192 rats) vise à évaluer l'effet de différents paramètres expérimentaux (souche de rat, sexe, luminosité) sur les effets d'un lot de produit déjà connu pour son efficacité. L'étude 2 (60 rats) vise à démontrer la reproductibilité du test et à réaliser un effet dose. Sur la base des études 1 et 2, une étude de puissance statistique et le design final des contrôles LCS seront établis. Un amendement sera déposé si nécessaire avant l'étude 3 (72 rats a priori) qui vise à réaliser une étude LCS en parallèle d'un EDC (saisine déjà existante) pour confirmer que les 2 tests permettent d'obtenir des résultats similaires. L'ensemble du projet vise à assurer la robustesse et la reproductibilité du nouveau contrôle.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets de ces lots de production car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) pour le remplacer (remplacement). Le nombre d'animaux est cependant limité au strict minimum afin de garantir la validité et l'interprétation scientifique des résultats (réduction). Les expérimentations permettront de remplacer une méthode d'évaluation de l'anxiété des animaux par une autre plus éthique (raffinement).

Les 3 procédures utilisées dans ce projet sont 1) le traitement par voie orale des animaux avec les composés à tester, 2) le placement des animaux dans un open-field pendant 5 min pour qu'ils découvrent la pièce expérimentale 7 min avant le LCS, et 3) le test comportemental du LCS où les animaux sont placés dans le dispositif expérimental pendant 5 min, 1 heure après traitement avec les composés à tester, et d'enregistrer leur comportement pendant 5 minutes.

Les animaux sont hébergés par 3 dans des cages ouvertes de 1300 cm<sup>2</sup> de surface, 18 cm de hauteur et placés en cycle de lumière inversé (lumière de 20h à 8h) afin de respecter leur chronobiologie et réaliser les études pendant leur phase d'activité, et également de respecter la chronopharmacologie des composés testés.

Un enrichissement sous forme de briques d'Aspen sera utilisé pour ce projet. Un contrôle du bien-être des rats est effectué quotidiennement tout au long de la présence des animaux au laboratoire (vocalises, piloérection, cachexie...), week-end et jours fériés inclus. Les animaux qui présenteraient un comportement anormal (arrêt de prises de nourriture ou de boisson, perte de poids, émission de vocalises, piloérection, cachexie...) seraient exclus de l'étude et une mise à mort en conformité avec les recommandations éthiques serait effectuée.

Les animaux issus de ce projet pourront être réutilisés pour de la recherche interne comme des entraînements à la chirurgie avec procédure sans réveil, ou donner à des établissements utilisateurs agréés pour des enseignements (travaux pratiques).

**20348** Les études de développement de vaccins sont soumises aux réglementations des différents pays utilisateurs/importateurs. Des autorités réglementaires demandent une étude sur animaux de l'innocuité et/ou du profil serologique lié aux vaccins volaille pour chacun des lots de produit devant être commercialisés. Ces études s'effectuent sur des poulets de 1 jour à 10 semaines d'âge (selon les spécifications du vaccin). Un maximum de 3900 poulets seront utilisés pour l'ensemble des procédures sur 5 ans.

Remplacement: Lors du développement de tels vaccins notre laboratoire collecte toute information utile pour faire valoir les contrôles *in-vitro* sur les vaccins ou les connaissances historiques sur des lots précédents afin de défendre la suspension de ces essais sur animaux. Le nombre maximum d'animaux évoqué ci-dessus représente le cas le plus défavorable ou aucune des requêtes de suspension d'essais sur animaux n'aboutirait.

Afin de réduire la douleur et l'anxiété des animaux, les mesures suivantes sont appliquées:

- Respect des normes d'hébergement (taille des cages, densité etc.) spécifiées dans la directive 2010 63 UE ;

- Application de conditions d'ambiance en accord avec l'âge et l'espèce (température, éclairage, hygrométrie) ;

- Fourniture d'eau et d'aliment (adapté aux besoins d'entretien ou de croissance des poulets) sans restriction ;
- Contention par du personnel qualifié ;
- Mise en place d'un suivi clinique par du personnel formé à l'expérimentation animale avec évaluation des points limites permettant d'euthanasier les animaux de façon anticipée.
- Mise en place de perchoir, diffusion de musique, litière à gratter afin d'enrichir le milieu des animaux

**20349** Dans le monde, le nombre de personnes atteintes de la maladie d'Alzheimer est estimé actuellement à 35,6 millions (dont 1.3 millions en France). D'autres maladies affectant le système nerveux ont un pronostic encore plus dramatique. Ce projet regroupe une partie des études de recherche conduites chez le Rongeur pour des candidats médicaments ayant pour but de soigner certaines de ces pathologies neurodégénératives, très invalidantes voire mortelles. En effet, de nombreux candidats médicaments sont en cours de développement afin d'améliorer le traitement de certaines maladies neurodégénératives. Dans la plupart des cas, une accumulation de protéines au niveau cérébral est en cause. Il est possible aujourd'hui de cibler l'ARN d'une protéine du cerveau au fonctionnement anormal pour l'éliminer. Cela nécessite la mise en œuvre de candidats médicaments qui doivent atteindre les cellules du système nerveux.

L'objectif des études incluses dans ce projet est d'évaluer la tolérabilité de ces candidats médicaments.

Le passage de la barrière hématoencéphalique étant critique, les futurs candidats médicaments devront être administrés au niveau des lombaires, entre les méninges (par injection intrathécale ou IT) chez le Rat ou au niveau des ventricules cérébraux (par injection dite intracérébro ventriculaire ou ICV) chez la Souris.

L'ensemble des études de ce projet est en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner), études pour lesquelles il n'existe pas d'alternative, validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement, à l'utilisation d'animaux. Des méthodes alternatives *in vitro* et *in silico* sont utilisées au préalable dans la sélection des molécules dans les stades précoces du développement. Les injections (ICV ou IT) seront réalisées sous anesthésie selon les règles de l'art avec un protocole d'analgésie adapté au cas par cas.

Les études incluses dans ce projet ont une durée de 1j à 4 semaines selon le mode d'administration prévu ensuite chez l'Homme et selon l'espèce rongeur utilisée. La voie d'administration IT utilisée dans ces études est celle prévue chez l'Homme, la voie ICV n'étant utilisée que chez les souris, la taille de l'animal étant un facteur limitant pour pratiquer une administration intrathécale.

L'administration sera unique quel que soit la technique d'injection utilisée.

Des examens réguliers seront faits à l'aide de matériel adapté à l'espèce et incluent majoritairement des observations cliniques, et occasionnellement un suivi du poids et de la consommation alimentaire, des prélèvements de sang et/ou de liquide céphalorachidien (LCR) pour vérifier le passage du candidat médicament dans le sang et la persistance du candidat médicament dans le cerveau. A la fin de l'étude des organes pourront être prélevés afin de réaliser un examen histologique et/ou vérifier la disponibilité du candidat médicament dans certaines parties du cerveau et d'éventuels autres organes cibles.

Le nombre d'animaux est choisi en fonction de la variabilité des paramètres examinés afin de permettre d'atteindre les objectifs de l'étude et est largement inférieur à celui des études réglementaires. Des grilles de points-limites spécifiques à ces techniques d'injection sont appliquées sous contrôle d'un vétérinaire afin de prendre des décisions très rapidement chaque fois que cela s'avère nécessaire. Ainsi, le degré de sévérité est suivi de manière approfondie et ne doit pas dépasser le stade modéré.

Le bénéfice apporté par ce projet est de permettre d'optimiser le développement de candidats médicaments en évaluant très précocement leur toxicité éventuelle (réduction ainsi du nombre d'études et du nombre d'animaux utilisé) et en ajustant au mieux les doses et le schéma

expérimental des études de toxicité sub-chronique et d'efficacité. L'objectif in fine étant de sécuriser l'utilisation de ces médicaments chez les volontaires sains puis les patients. Selon le nombre de candidats médicaments *in vivo*, un nombre maximal de 600 animaux sera utilisé chaque année (400 souris et 200 rats), correspondant à un total maximum de 3000 rongeurs sur 5 ans.

**20350** Le diagnostic précoce et le traitement des tumeurs, en particulier cérébrales, sont un enjeu majeur de santé publique. Le glioblastome, tumeur primaire la plus fréquente dans le cerveau, reste une maladie incurable à ce jour. L'un des obstacles majeurs réside dans la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui limite le passage des molécules diagnostiques et thérapeutiques du sang vers les tissus tumoraux. Pour compenser cette limitation, les agents chimio thérapeutiques sont souvent administrés à des doses importantes, provoquant des effets indésirables sur l'organisme.

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser des nanoparticules (NPs), molécules de taille inférieure à 60 nm leur permettant de franchir la BHE et accéder aux tissus cérébraux. Les NPs étudiées posséderont des propriétés diagnostiques (agents de contraste), mais également des propriétés thérapeutiques qui seront évaluées pour le traitement de tumeurs sur des modèles rongeurs (rats et souris). L'accumulation des NPs dans la zone tumorale sera optimisée par fonctionnalisation (par exemple en greffant un anticorps ou un peptide à la surface), afin que les NPs se fixent spécifiquement à des cibles physiologiques (biomarqueurs tumoraux). Ces biomarqueurs, présents dans la tumeur et non dans les tissus sains environnants, permettent la reconnaissance spécifique des cellules tumorales par les NPs fonctionnalisées. Celles-ci, une fois administrées et concentrées dans la tumeur, seront activées par stimulations externes en fonction de leurs propriétés (magnétique, optique) afin d'induire un effet anti-tumoral. Par exemple, certaines nanoparticules magnétiques, contenant un cœur d'oxyde de fer, peuvent s'échauffer sous l'action d'un champ magnétique : cet effet d'hyperthermie magnétique va provoquer une augmentation de la température dans la tumeur et participer à la destruction des cellules cancéreuses. À cette étape du projet, le modèle animal ne peut pas être substitué par un modèle cellulaire ou de simulation informatique il est nécessaire d'étudier dans un organisme vivant les relations entre le devenir des NPs (pharmacocinétique) et la modulation de la pathologie (pharmacodynamique), d'évaluer la tolérance et les propriétés thérapeutiques de ces NPs avant d'envisager un transfert à l'Homme.

Le suivi de la croissance tumorale, ainsi que l'accumulation de NPs dans la tumeur, seront contrôlés et quantifiés par imagerie non invasive (Imagerie par Résonance Magnétique, IRM). Pour certains modèles animaux de tumeurs infiltrantes (comme les modèles de tumeurs pédiatriques), l'IRM ne permet pas de visualiser la progression tumorale aux temps précoces : les cellules cancéreuses utilisées seront transfectées afin d'exprimer un marqueur fluorescent, de façon à pouvoir suivre plus facilement l'infiltration tumorale dans les tissus en utilisant un imageur de type FMT (microtomographie de fluorescence). De plus, pour favoriser la délivrance des NPs dans certaines tumeurs cérébrales, nous proposons d'utiliser un dispositif transcrânien ultrasonore : cette technique a déjà montré qu'il est possible d'induire une ouverture non invasive, réversible et localisée de la BHE pour quelques heures, favorisant le passage de molécules (de taille inférieure à 60 nm) vers le site tumoral tout en épargnant les tissus sains environnants. Nous évaluerons enfin l'efficacité des NPs et des techniques de stimulation sur la croissance tumorale par des méthodes d'imagerie (IRM, FMT), l'objectif étant de corréler l'effet thérapeutique à la biodistribution intra-tumorale de NPs.

Les propriétés des NPs seront évaluées sur des modèles rongeurs (rats et souris), modèles les plus utilisés en oncologie car ils reproduisent différentes configurations pathologiques observées chez l'homme. Les modèles de tumeurs étudiées seront principalement des modèles de tumeurs cérébrales, soit humaines (glioblastomes et tumeurs pédiatriques), soit murines. D'autres modèles de tumeurs, non cérébrales mais présentant des biomarqueurs intéressants pour le diagnostic ou la thérapie, seront étudiés dans le cadre de la recherche sur le cancer du sein, du côlon et de la peau.

Notre étude a été conçue dans le respect de la règle des 3R. Dans une première approche, des expériences *in vitro* permettront d'étudier les interactions entre NPs et cellules cancéreuses, afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires. En effet, seules les NPs ayant montré une efficacité et une biocompatibilité *in vitro* seront utilisées *in vivo*. L'utilisation de dispositifs d'IRM adaptés à la taille du rongeur et fonctionnant à très haut champ magnétique permet de mieux appréhender les pathologies d'un point de vue anatomique et fonctionnel, et de suivre les réponses à un traitement. Le caractère non invasif de ces techniques diminue le nombre d'animaux utilisés pour obtenir la même quantité d'information par un suivi longitudinal (répétition des sessions d'imagerie à différents temps). De plus, le nombre d'animaux utilisés (613 souris, 279 rats) a été évalué à partir d'expérimentations précédentes pour mettre en évidence des effets diagnostiques et thérapeutiques statistiquement significatifs. Les protocoles expérimentaux ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Les animaux, une fois obtenus auprès d'élevages agréés, seront hébergés en groupe dans des cages munies de modules d'enrichissement (accessoires de jeu, fabrication de nids). Leur état de santé sera étroitement suivi tout au long de l'étude, afin d'intervenir immédiatement dès le moindre signe de souffrance et d'appliquer les critères d'arrêt en cas d'événement inattendu qui compromettrait le bien-être d'un animal.

**20351** Ces dix dernières, les immunothérapies ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer. En éduquant nos défenses immunitaires à reconnaître spécifiquement les cellules tumorales, ces traitements permettent en effet de guérir du cancer avec peu de toxicité et de façon durable, à la différence des traitements standards de chimiothérapie et radiothérapie. Malgré ces avancées majeures, les immunothérapies sont efficaces chez une minorité (<30%) de patients seulement.

Dans ce contexte, nous cherchons à caractériser à l'aide de modèles de souris, quelle réaction immunitaire est indispensable au succès des immunothérapies.

Notre programme de travail repose sur l'observation fondamentale que les cellules T et les cellules myéloïdes, deux sous-populations majeures de notre système de défense immunitaire qui patrouillent dans notre organisme et infiltrent les tumeurs, sont stimulées par les immunothérapies. Notre étude vise à comprendre comment, grâce aux immunothérapies, ces cellules activées communiquent entre elles pour contrôler de façon durable, à la fois la croissance des tumeurs primaires et des métastases.

Pour cela, nous comparerons successivement l'efficacité de trois immunothérapies dans un modèle de tumeur mammaire transplantée chez la souris et nous évaluerons l'efficacité de ces traitements après une chirurgie de la tumeur mammaire, comme cela est proposé chez l'homme, et dans un modèle spontané de tumeur mammaire chez des souris transgéniques.

Ce programme nécessitera un total de 1092 souris sur une période de 5 ans.

Il sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R:

Remplacement:

Le recours aux modèles de tumeurs chez la souris nous permettra de mesurer après immunothérapie la décroissance de la tumeur primaire et des métastases, qui résulte d'une migration des cellules tumorales et de facteurs solubles via la circulation sanguine, et d'identifier les cellules immunitaires qui sont mobilisées depuis les organes lymphoïdes pour infiltrer et s'activer dans les tissus tumoraux. Ces paramètres ne peuvent pas être observés *in vitro* et le recours à l'animal est donc nécessaire dans le cadre de cette étude.

Réduction:

Un suivi longitudinal de la croissance des tumeurs sera réalisé par palpation des tumeurs et par bioluminescence afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes contrôles. Les données de la littérature sur le modèle tumoral ainsi que nos travaux antérieurs sur les immunothérapies, nous ont permis de déterminer le nombre d'animaux optimal qui sera nécessaire pour obtenir des résultats

statistiquement significatifs sur l'efficacité du traitement à contrôler la croissance tumorale et à stimuler la réponse immunitaire associée.

Raffinement:

Les immunothérapies ne sont pas toxiques à la différence des traitements conventionnels et les interventions (injections et prélèvements sanguins) seront précédées d'une anesthésie générale, complétée d'un analgésique dans les cas d'exérèse de la tumeur mammaire chez certaines souris, afin de prévenir la douleur.

Nous utiliserons la bioluminescence pour un suivi de la charge tumorale, ce qui nous permettra de définir un critère d'efficacité des immunothérapies basé sur cette approche pour les études ultérieures.

Les souris seront surveillées quotidiennement pendant toute la durée de la procédure expérimentale afin de déceler et notifier rapidement tout signe de changement de comportement ou d'état de santé des animaux. En cas de modifications du comportement normal ou de l'état de santé des souris, des actions visant à prévenir la douleur ou l'angoisse seront appliquées. L'atteinte des points limites définis en amont entraînera une mise à mort anticipée si nécessaire.

Ce projet devrait ainsi permettre de mieux comprendre comment les immunothérapies stimulent efficacement notre système immunitaire pour protéger du développement des cancers sur le long terme.

**20352** Les dispositifs médicaux implantables sont utilisés pour remplacer, suppléer, soulager une fonction et donc améliorer la santé.

Le lymphome anaplasique à grandes cellules (ALCL) est une pathologie nouvelle. Ce cancer se développe uniquement chez des patientes porteuses d'implants mammaires (esthétique ou après reconstruction du sein). En 2018, 656 ALCL ont été recensés (1). La physiopathologie de cette maladie découverte en 2011 reste inconnue. Les premières études supposent qu'une inflammation chronique autour des implants stimule les cellules T. Cette inflammation chronique entraînerait une transformation cancéreuse de ces cellules T aboutissant au ALCL (2,3). La contamination bactérienne lors de la pose initiale des implants pourrait favoriser le phénomène d'inflammation chronique.

L'inflammation autour d'un implant est liée à sa biocompatibilité. La biocompatibilité d'un matériau désigne sa capacité à être tolérée par un organisme vivant. Cette compatibilité est nécessaire pour que le matériau ne soit pas rejeté par le système immunitaire (4).

Un corps étranger implanté dans un organisme entraîne une réaction biologique avec la création d'une membrane biologique (encore appelée capsule). L'architecture cellulaire de cette membrane ressemble aux membranes entourant les articulations (5).

Le polyNaSS est un polymère bioactif. Ce polymère a déjà été testé avec succès sur le titane en condition expérimentale *in vitro* et *in vivo* chez l'animal avec une diminution de 70 % de l'adhésion des bactéries et une augmentation de la biocompatibilité (6). Une étude sur l'homme est actuellement en cours.

Nous allons réaliser une analyse comparative de la membrane biologique induite par des implants en silicone traités par le polyNaSS et des implants en silicone non traités (témoin) implanté dans le tissu sous-cutané des lapins. Une précédente étude sur la silicone traitée par copolymère (ancêtre du polyNaSS) avait déjà démontré une diminution de l'adhésion bactérienne et une amélioration de la biocompatibilité *in vitro* et *in vivo* (7).

Les alternatives de remplacement :

Les expérimentations fondamentales *in vitro* ont déjà été effectuées avec des résultats probants (6,6–8). Il est nécessaire de tester le nouveau polymère *in vivo* pour analyser la membrane biologique induite par le nouveau polymère greffé sur le silicone. Seul l'animal vivant peut simuler la formation de cette membrane. Le lapin est l'animal de choix permettant l'implantation d'implants mammaires identiques à l'Homme.

Les alternatives de réduction :

Chaque lapin sera son propre témoin permettant de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés. Pour terminer l'étude 17 lapins seront nécessaires. Chaque lapin sera son propre témoin : 15 implants greffés par polyNaSS seront introduits sur le côté droit et 15 implants non greffés sur le côté gauche. Les implants seront retirés après 45 jours et des prélèvements de la membrane biologique seront réalisés. Deux lapins supplémentaires sont prévus pour la maîtrise des techniques.

Les alternatives de raffinement :

Prévention de la douleur :

L'intervention aura lieu sous anesthésie générale.

L'injection sous cutanée d'un anesthésiant local de longue durée d'action (Ropivacaine) au niveau de la zone opérée va permettre une analgésie >12 heures de la zone opératoire.

Surveillance de la douleur :

La douleur sera régulièrement évaluée en per et post opératoire par des critères cliniques : tachypnée, polypnée, tachycardie et température. Le comportement de l'animal sera surveillé : posture, mobilité, toilettage, sécrétions nasales, la prise alimentaire, la réaction à la manipulation.

De plus, nous utiliserons la grille d'évaluation de la douleur (Annexe II) aidé par la grille adaptée aux lapins : « Rabbit Grimace Scale » (Annexe 1) pour objectiver la douleur du lapin (9,10).

Traitement antalgique :

Le traitement antalgique post-opératoire comprendra des AINS (Méloxicam 1 mg/kg) toutes les 12 heures en per os pendant 5 jours. Il pourra être associé une dose de Buprénorphine (0.05 mg/kg) administrée en sous-cutané toutes les 8 heures pendant les 48 premières heures. Il sera adapté en fonction de la douleur. En cas de non contrôle de la douleur, la Buprénorphine sera remplacée par de la Morphine (1-2 mg/kg).

En cas de signe de douleur trop intense et non contrôlable, nous procéderons à la mise à mort anticipée de l'animal selon le protocole prévu.

Soins post-opératoires :

Les plaies seront désinfectées quotidiennement. L'alimentation sera surveillée et en cas de difficulté alimentaire, un supplément mixé sera fourni aux lapins. La quantité d'eau bu par les animaux sera surveillée pour détecter un trouble du comportement. Les lapins seront enveloppés dans une couverture en post-opératoire afin d'éviter une déperdition de chaleur. La température ambiante sera contrôlée et surveillée pour assurer le bien-être des animaux.

**20353** La plupart des pathologies cérébrales ont une évolution relativement lente, avec une période pré-symptomatique qui précède de nombreuses années les déficits cognitifs. De nombreuses études ont souligné l'importance de cette fenêtre temporelle pré-symptomatique pour commencer à soigner la pathologie. Pour la maladie d'Alzheimer (MA), ralentir la progression de la pathologie est la seule approche thérapeutique prometteuse. La recherche de paramètres physiologiques quantifiables rapportant et « mesurant » fidèlement la progression d'une pathologie donnée (biomarqueurs) est particulièrement difficile pour le cerveau qui est inaccessible pour l'instrumentation clinique courante et ne convient pas aux biopsies. L'IRM est l'approche de préférence pour identifier des biomarqueurs cérébraux. Au cours des dernières années, les techniques d'IRM ont évolué, permettant de mesurer non seulement les caractéristiques anatomiques, mais aussi les paramètres fonctionnels, tels que les changements d'oxygène et de métabolites lors de l'activation neuronale, ouvrant de nouvelles voies pour la découverte de biomarqueurs cérébraux. Cependant, pour qualifier un paramètre mesurable en tant que biomarqueur, celui-ci doit s'avérer efficace pour discriminer et quantifier une pathologie sur une large cohorte de patients et de sujets sains. Dans cette étude, nous rechercherons des nouveaux biomarqueurs de vieillissement et de la MA, chez des rongeurs sains ou modélisant la MA, sur la base de mesures effectuées au moyen de scanners IRM ultra-haute résolution. Nous essaierons de réduire le nombre des animaux utilisés en utilisant

le même animal pour des acquisitions multiples, en le suivant au cours du vieillissement. L'utilisation des rongeurs (154 souris, 308 rats) est imposée par la nécessité de suivre le vieillissement dans un laps de temps compatible avec le projet expérimental (la durée de vie des rongeurs est de quelques années).

Les enregistrements IRM permettront de suivre dans le temps les changements anatomiques et fonctionnels du cerveau en matière de structure, de distribution des métabolites/neurotransmetteurs et d'oxygénation cérébrale. Les données fonctionnelles seront acquises à l'aide de stimulations sensorielles (stimuli visuels et olfactifs). De plus, sur la base de mesures en absence de stimulation, nous calculerons des cartes de connectivité fonctionnelle cérébrale qui reflètent l'organisation en réseau de l'activité cérébrale et qui se sont déjà révélées être des sources prometteuses de biomarqueurs chez l'homme. Enfin, l'enregistrement de modèles animaux avec des scanners IRM à ultra-haut champ magnétique nous permettra d'évaluer l'intérêt d'identifier les éventuels obstacles techniques de l'utilisation de ces scanners de nouvelle génération, de plus en plus répandus en clinique.

Tous les animaux seront hébergés en groupe. Un enrichissement du milieu de vie sera systématiquement ajouté dans chaque cage afin de diversifier les interactions de l'animal. Pour éviter toute douleur ou souffrance de l'animal, des protocoles analgésiques et anesthésiques seront mis en place après avis vétérinaire.

**20354** L'organe voméronasal est un organe bilatéral situé dans la cavité nasale de la plupart des animaux, constitué de nombreux récepteurs permettant de capter les messages chimiques présents dans l'environnement. Ces derniers sont échangés entre les animaux dans un but de communication et d'échanges sociaux, territoriaux, sexuels... La capacité de cet organe à assurer la réception de ces messages et les transmettre au cerveau pour leur analyse via un réseau neuronal lui confère un rôle clé dans la communication inter et intra spécifique. Il a déjà été prouvé plusieurs fois qu'une altération de cet organe, qu'elle soit expérimentalement induite ou naturelle, pouvait être liée à des changements de comportements, comme l'agressivité ou des modifications des comportements maternels.

L'organe voméronasal possède de nombreuses similitudes avec la muqueuse olfactive, qui est plus fortement étudiée. Il a été prouvé chez le lapin et la souris qu'une respiration de vapeurs toxiques et/ou d'un environnement pollué induisait des lésions, inflammations et autres dégradations au niveau de cette muqueuse. C'est le cas en présence de quantités trop élevées d'ammoniac, un gaz irritant et corrosif. L'ammoniac est produit lors de la décomposition des matières biologiques, et peut s'avérer être présent en grandes quantités dans les élevages possédant une forte densité d'animaux et/ou un système d'aération insuffisant.

Le but de cette étude est de tester la toxicité de l'ammoniac en concentrations représentatives des conditions d'élevages afin de pouvoir approfondir les connaissances sur le sujet, comme la caractérisation et quantification des signes de dégénérescence observées dans l'organe voméronasal, et de tenter d'apporter plus de précisions quant au seuil de concentration critique induisant des modifications chez ces animaux.

Pour mener à bien ce projet, nous envisageons d'utiliser sur le modèle souris, car nous avons réalisé une étude de caractérisation des dégénérescences de cet organe sur ce modèle, et nos données seront donc complétées aux analyses « sans exposition chimique » que nous possédons déjà. Le nombre de souris à utiliser sera le minimum permettant d'obtenir des différences significatives fiables. Nos précédents essais ont obtenu des résultats significatifs entre des groupes de 10 individus. Les paramètres à observer étant sensiblement les mêmes, nous pouvons donc nous permettre de réaliser le même design d'étude et donc d'inclure 10 souris par groupes testés.

Les souris seront placées dans des cages d'élevage classique, contenant de l'eau et de la nourriture à volonté, de la litière en quantité suffisante ainsi que des éléments d'enrichissement. Ces cages seront installées dans une enceinte semi-fermée (permettant l'apport d'oxygène nécessaire aux animaux) en présence d'ammoniac en diffusion contrôlée à une concentration retrouvée dans des conditions normales hautes d'élevage, pendant 21 jours. Tout au long de l'étude et de

l'exposition à la molécule, le suivi de bien-être des animaux et la concentration en ammoniac dans le dispositif seront relevés quotidiennement par du personnel qualifié. Au moindre signe de souffrance des animaux, comme une difficulté respiratoire, une modification de la mobilité/du comportement, ou l'apparition de stéréotypies, la procédure sera interrompue. A la fin du temps imparti, les animaux seront euthanasiés afin de récupérer et analyser leur organe voméronasal pour les études complémentaires.

Les échantillons seront stockés dans une « banque d'organes », afin de pouvoir incrémenter les analyses futures sans nécessité d'avoir recours à de nouveaux animaux. De la même manière, notre banque existante, créée lors de précédents projets s'intéressant à physiologie « naturelle » de l'organe voméronasal de souris, sera utilisée pour réaliser les tests des groupes « contrôles », non exposés à ce gaz. Ceci nous permettra de réduire au maximum le nombre d'individus utilisés dans ce projet.

Pour résumer, ce projet apportera plus de précisions quant à l'impact de fortes concentrations en ammoniac dans les élevages, avec des données quantitatives et qualitatives plus précises sur la sensibilité de l'organe voméronasal face à des contaminations de l'air environnant.

**20355** Ces dix dernières, les immunothérapies ont révolutionné la prise en charge des patients atteints de cancer. En éduquant nos défenses immunitaires à reconnaître spécifiquement les cellules tumorales, ces traitements permettent en effet de guérir du cancer avec peu de toxicité et de façon durable, à la différence des traitements standards de chimiothérapie et radiothérapie. Malgré ces avancées majeures, les immunothérapies sont efficaces chez une minorité (<30%) de patients seulement.

Dans ce contexte, nous cherchons à caractériser à l'aide de modèles de souris, quelle réaction immunitaire est indispensable au succès des immunothérapies.

Notre programme de travail repose sur l'observation fondamentale que les cellules T et les cellules myéloïdes, deux sous-populations majeures de notre système de défense immunitaire qui patrouillent dans notre organisme et infiltrent les tumeurs, sont stimulées par les immunothérapies. Notre étude vise à comprendre comment, grâce aux immunothérapies, ces cellules activées communiquent entre elles pour contrôler de façon durable, à la fois la croissance des tumeurs primaires et des métastases.

Pour cela, nous comparerons successivement l'efficacité de trois immunothérapies dans un modèle de tumeur mammaire transplantée chez la souris et nous évaluerons l'efficacité de ces traitements après une chirurgie de la tumeur mammaire, comme cela est proposé chez l'homme, et dans un modèle spontané de tumeur mammaire chez des souris transgéniques.

Ce programme nécessitera un total de 1092 souris sur une période de 5 ans.

Il sera réalisé dans le respect de la règle des 3 R:

Remplacement:

Le recours aux modèles de tumeurs chez la souris nous permettra de mesurer après immunothérapie la décroissance de la tumeur primaire et des métastases, qui résulte d'une migration des cellules tumorales et de facteurs solubles via la circulation sanguine, et d'identifier les cellules immunitaires qui sont mobilisées depuis les organes lymphoïdes pour infiltrer et s'activer dans les tissus tumoraux. Ces paramètres ne peuvent pas être observés *in vitro* et le recours à l'animal est donc nécessaire dans le cadre de cette étude.

Réduction:

Un suivi longitudinal de la croissance des tumeurs sera réalisé par palpation des tumeurs et par bioluminescence afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les groupes d'études sont fait le plus souvent en même temps afin de réduire le nombre de groupes contrôles. Les données de la littérature sur le modèle tumoral ainsi que nos travaux antérieurs sur les immunothérapies, nous ont permis de déterminer le nombre d'animaux optimal qui sera nécessaire pour obtenir des résultats



statistiquement significatifs sur l'efficacité du traitement à contrôler la croissance tumorale et à stimuler la réponse immunitaire associée.

Raffinement:

Les immunothérapies ne sont pas toxiques à la différence des traitements conventionnels et les interventions (injections et prélèvements sanguins) seront précédées d'une anesthésie générale, complétée d'un analgésique dans les cas d'exérèse de la tumeur mammaire chez certaines souris, afin de prévenir la douleur.

Nous utiliserons la bioluminescence pour un suivi de la charge tumorale, ce qui nous permettra de définir un critère d'efficacité des immunothérapies basé sur cette approche pour les études ultérieures.

Les souris seront surveillées quotidiennement pendant toute la durée de la procédure expérimentale afin de déceler et notifier rapidement tout signe de changement de comportement ou d'état de santé des animaux. En cas de modifications du comportement normal ou de l'état de santé des souris, des actions visant à prévenir la douleur ou l'angoisse seront appliquées. L'atteinte des points limites définis en amont entraînera une mise à mort anticipée si nécessaire.

Ce projet devrait ainsi permettre de mieux comprendre comment les immunothérapies stimulent efficacement notre système immunitaire pour protéger du développement des cancers sur le long terme.

**20356** L'énergie de notre organisme est apportée par des structures présentes dans toutes nos cellules appelées mitochondries. Certaines maladies génétiques affectent le fonctionnement des mitochondries ce qui se traduit par des symptômes de sévérité variable. Le syndrome de Leigh est l'une des maladies mitochondriales les plus sévères car elle se manifeste dès les premières années de la vie et entraîne le décès avant l'âge de 20 ans. Aucun traitement n'est disponible pour cette maladie car il est difficile de remplacer le gène défectueux dans tout l'organisme et notamment le cerveau. En utilisant un nouvel outil de thérapie génique, notre équipe a réussi à palier à cette difficulté et a montré que le remplacement d'un gène défectueux dans de nombreuses cellules, y compris dans le cerveau, permet d'obtenir un effet thérapeutique dans un modèle de souris du syndrome de Leigh.

Etant donné que le remplacement du gène défectueux n'est obtenu que dans une partie des cellules, nous nous sommes interrogés sur la possible implication d'autres mécanismes qui participeraient à l'effet thérapeutique.

En effet, il a été montré que les cellules en culture peuvent échanger des mitochondries entre elles. Ce phénomène reste peu connu et n'a jamais été décrit dans le contexte de la thérapie génique. Nous avons récemment mis au point un outil génétique qui nous permet de distinguer des cellules donneuses de celles receveuses de mitochondries. Nous avons validé cet outil dans un système de culture de cellules.

Afin d'expliquer plus précisément l'effet thérapeutique obtenu dans le modèle de souris du syndrome de Leigh, il est à présent nécessaire de vérifier si le phénomène de transfert de mitochondries entre cellules se produit dans un organisme entier et notamment dans le cerveau. Ceci sera analysé par des approches histologiques et moléculaires.

Ce projet est composé de 2 procédures expérimentales et requerra l'utilisation d'un maximum de 136 souris sur 5 ans.

Réduction: Ce nombre d'animaux a été déterminé par une approche statistique de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées.

Raffinement: Le projet implique la mise en place d'un traçage cellulaire chez le rongeur avec une approche expérimentale de classe modérée. Les injections par voie intraveineuse seront effectuées sous anesthésie générale. L'état de santé des animaux ainsi que leur niveau de douleur sera

surveillé et évalué tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

Remplacement: Nous avons à ce jour appliqué le principe de remplacement en menant des expériences sur des cellules en cultures. Ces expériences ont permis d'obtenir des résultats prometteurs qui justifient de tester notre hypothèse de travail chez l'animal. L'analyse de ces échanges entre cellules permettra de mieux comprendre les effets comportementaux, hépatiques, cardiaques, neuroprotecteurs que nous avons décrits dans une publication précédente.

**20357** La créatine (Cr) est une molécule qui permet aux cellules cérébrales et musculaires de se constituer une réserve d'énergie. Elle passe dans le sang et rentre dans le cerveau et les muscles via le transporteur de la créatine (CRTR). Le déficit en transporteur de la créatine lié à l'X est une maladie neurologique rare dans laquelle l'absence de Cr au niveau cérébral conduit à des retards mentaux sévères, un syndrome autistique et des crises d'épilepsie chez les enfants. Cette maladie représente 1 à 2% des retards mentaux liés à l'X. A ce jour, aucun traitement n'est disponible. En effet, les approches par supplémentation en Cr ne sont pas efficaces du fait de l'absence de passage passif de la Cr à travers la barrière hémato-encéphalique et la membrane des cellules cérébrales en l'absence de transporteurs.

Nous avons démontré que l'utilisation du Dodecyl Creatine Ester (DCE) sous forme de microémulsion permet l'amélioration des fonctions cognitives dans un modèle murin de la maladie ainsi qu'une restauration des niveaux de Cr dans différentes aires cérébrales. Pour mieux caractériser ce composé et ses effets, il est important de mettre en place des outils de suivi non invasifs et de poursuivre ces expériences dans des modèles d'étude précliniques plus pertinents.

L'objectif de ce projet est double : 1/ valider une stratégie thérapeutique innovante utilisant une microémulsion de DCE administrée par voie nasale et 2/ valider des méthodes d'imagerie originales pour suivre la restauration des niveaux de créatine cérébraux *in vivo*.

En effet, la créatine étant présente de façon naturelle dans les organismes vivants (exceptés ceux qui ont la maladie du déficit en transporteur de la créatine), nous utilisons de la créatine marquée au deutérium pour la différencier de la créatine endogène. Le deutérium porté par la créatine peut ensuite être détecté par IRM. Le bénéfice de cette étude est d'intégrer, dans un projet de développement préclinique, des outils d'imagerie permettant d'étudier la pharmacologie de molécules médicamenteuses dérivées de composés endogènes, et de raffiner les protocoles expérimentaux en utilisant moins d'animaux sur un suivi longitudinal et en évitant de sacrifier des animaux. Au-delà du bénéfice pour les projets précliniques, ces nouveaux outils d'imagerie fournissent des biomarqueurs qui trouveront une place majeure dans le contexte clinique. Ces biomarqueurs pourront permettre le suivi de l'efficacité des traitements chez les patients (enfants), et aider à l'ajustement des doses thérapeutiques.

Le projet comporte deux volets :

1) Une étude sur 200 souris, dans laquelle nous évaluerons l'incorporation cérébrale et périphérique du DCE par IRM dans des animaux sains et dans des animaux transgéniques modèle de la pathologie (déficient pour le transporteur de la créatine). Nous utiliserons l'imagerie IRM du deutérium ou non pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements sanguins seront effectués en complément, après chaque examen IRM, pour mesurer la concentration plasmatique de créatine marquée.

2) Une étude sur 6 macaques sains pour démontrer l'efficacité du mode d'administration intranasale et étudier la biodistribution cérébrale du DCE par IRM. Nous utiliserons également l'imagerie IRM du deutérium pour quantifier la créatine dans le cerveau de façon répétée et non traumatique pendant et après un traitement d'un mois. Des prélèvements de sang et de liquide céphalorachidien seront effectués en complément.

Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui d'évaluer l'effet de cette stratégie thérapeutique d'utilisation de la voie nasale pour cibler

directement le cerveau (voie « nose-to-brain ») via les nerfs olfactifs et trijumeaux. Seul un modèle animal permet de tenir compte des interactions structurelles et fonctionnelles de ces nerfs et cellules, et ainsi de valider un biomarqueur d'imagerie *in vivo* et une voie d'administration originale. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviendront d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire afin d'obtenir des données suffisantes pour valider les nouvelles méthodologies sous différentes conditions.

Les procédures expérimentales de ce projet ont un degré de sévérité « modéré ». Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts spécifiques et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi permettent de garantir le bien-être des animaux.

**20358** L'augmentation endémique de la prévalence et de l'incidence du diabète de type 2 (DT2) ainsi que de l'obésité est internationalement reconnue. En 2019, plus de 463 millions de personnes étaient diabétiques dans le monde, soit presque 10% de la population mondiale. Les estimations prédisent que cette prévalence atteindra 578 millions de patients en 2030 et 700 millions en 2045, faisant ainsi du diabète la première pandémie de maladie non-contagieuse. En 2019, le diabète, directement ou indirectement via ses complications, a tué 4.2 millions de personnes et le nombre de décès associés au diabète va doubler d'ici 2040. Si le diabète de type 2 (DT2) était considéré, il y a encore quelques années, affectant uniquement les adultes, il est observé depuis quelques années chez les enfants avec une prévalence de plus en plus importante. Cet élément devient préoccupant pour la communauté médicale. On attribue classiquement cette explosion de la maladie au style de vie occidental. Le DT2 est une maladie multifactorielle, résultant de l'interaction entre des facteurs de prédisposition génétique et des facteurs d'environnement (obésité, sédentarité, surnutrition...). La physiopathologie du DT2 peut schématiquement être résumée à deux anomalies interdépendantes : d'une part la diminution de la sensibilité des tissus-cibles (foie, tissu adipeux blanc, muscle squelettique) aux effets de l'insuline et d'autre part une détérioration progressive de la masse anatomique et de la fonction de la cellule  $\beta$  du pancréas, siège de la production d'insuline seule hormone permettant de réguler le taux de glucose dans le sang (glycémie).

Le but de ce projet est de pouvoir identifier des candidats médicaments efficaces dans le DT2 ou de pouvoir repositionner comme traitement du DT2 des médicaments commercialisés à l'heure actuelle dans d'autres indications. 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 pathologie. Nos modèles de rats génétiquement altérés présentent certaines physiopathologies communes aux patients diabétiques de type 2 et nous permettent une compréhension des mécanismes impliqués dans l'installation de la maladie ainsi que ceux impliqués dans l'efficacité et la spécificité des produits testés.

Les composés pourront être évalués après traitement aigu ou chronique du rat, via différents types de tests fonctionnels couramment utilisés chez l'homme et définis pour chaque étude en fonction du besoin, tels que 1) des tests de tolérance au glucose pour lesquels une surcharge en glucose est administrée par voie orale, intrapéritonéale ou intra-veineuse puis le profil de la glycémie et de l'insuline est suivi sur quelques heures pour déterminer l'effet du composé sur le contrôle glycémique. 2) des tests de sensibilité à l'insuline pour lesquels le profil glycémique du rat est suivi après administration d'insuline. 3) des tests de production de glucose endogène pour lesquels la glycémie est suivie pendant quelques heures après administration de pyruvate par voie orale 4) des tests de challenge lipidique pour lesquels un bolus d'huile d'olive est administré par voie orale puis les variations de lipides circulants (Triglycérides, Acides gras libres...) sont suivies dans le sang. Les études, lorsqu'elles sont chroniques, nous permettent également de suivre la composition corporelle des animaux (masse grasse, masse maigre et eau) à l'aide d'une méthode non invasive l'Echo MRITM.

En fin d'étude, après euthanasie des animaux, des mesures biochimiques sanguines et/ou tissulaires pourront être réalisées afin d'approfondir la caractérisation des effets observés.

Remplacement : Ces études d'efficacité réalisées *in vivo* ne sont entreprises qu'après avoir prouvé une sélectivité cible-dépendante, une efficacité dans des tests cellulaires *in vitro* ainsi qu'après avoir étudié le profil pharmacocinétique des produits à tester. Ces études peuvent être réalisées comme première étude de preuve de concept chez le rat lorsque la cible d'intérêt n'est pas exprimée chez la souris ou en deuxième intention après avoir réalisé dans un premier temps une étude chez la souris. Dans ce dernier cas, l'intérêt est de pouvoir générer une preuve de concept dans l'espèce utilisée pour des études de toxicologie.

Du fait du caractère polygénique (impliquant plusieurs gènes) de la maladie chez l'homme, les modèles animaux utilisés dans le cadre de la recherche de nouveaux traitements médicamenteux miment différentes facettes de la maladie ; il peut s'agir de modèles présentant une hyperglycémie et/ou une obésité et/ou une insulino-résistance, choisis en fonction du mécanisme d'action présumé du candidat médicament à tester et de la cible pharmacologique. Actuellement il existe différents modèles de rats utilisés dans le cadre de la recherche d'un antidiabétique efficace à long terme ; les plus couramment utilisés sont des rats développant spontanément un diabète. L'effet à long terme sur le métabolisme glucidique et lipidique ne peut être évalué qu'après un traitement aigu ou chronique de plusieurs semaines (selon le candidat médicament à tester) chez l'animal car il résulte de l'intégration de toutes les interactions métaboliques, hormonales, inflammatoires et neuronales contrôlant l'ensemble des tissus impliqués dans la pathologie. 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.

Reduction : Afin de réduire le nombre d'animaux, une analyse statistique de l'effectif nécessaire a été réalisée dans ces modèles sur quelques études réalisées précédemment dans le cadre d'un projet autorisé. On estime à environ 50 le nombre d'animaux par étude et on suppose pouvoir réaliser 5 études par an (soit sur 5 ans environ 1250 animaux).

Raffinement :

La limite d'âge, pour inclure les animaux dans une étude, déterminée à 30 semaines pour les rats présentant diabète ou obésité doit permettre de limiter l'apparition de signes de souffrance liés à l'avancement de la pathologie pendant l'étude. Les rats seront utilisés à l'âge adulte et seront hébergés en groupes sociaux, afin d'assurer leurs comportements d'espèce grégaire, dans des cages enrichies d'un bâtonnet en bois, de litière adaptée et de hutte. Tous ces éléments leur permettent d'exprimer leurs comportements naturels tels que ronger, le fouissage et l'exploration, ou encore la nidification et la possibilité de s'abriter. Ils feront de plus l'objet d'une observation visuelle et comportementale quotidienne et une attention particulière sera apportée à la litière et à la prise hydrique

**20359** Le but de ce projet est de demander une dérogation à la méthode de mise à mort permettant, sous anesthésie générale, de procéder à un prélèvement sanguin sans activation des plaquettes.

Les plaquettes sont très abondantes dans le sang et dans les poumons, et sont aujourd'hui reconnues pour leur fonction dans la réponse immunitaire ainsi que la promotion de l'inflammation. Dans le but de mieux comprendre ces fonctions, nous avons besoin d'isoler des plaquettes sanguines sans induire leur activation. Cela requiert une procédure rapide de prélèvement sanguin important tout en empêchant l'activation des plaquettes (très sensibles), ce qui fausserait les résultats. Le prélèvement sanguin devant être le plus important possible pour une préparation de plaquettes efficace, il est réalisé sous anesthésie générale, et sans réveil.

Les conditions d'hébergement sont celles requises par l'annexe II de l'arrêté relatif à l'agrément des EU. Le projet pourra comporter jusqu'à 400 animaux au total sur la période de 5 ans.

Le prélèvement sanguin sera effectué sur des souris de souches C57BL/6 ou Balb/C, et sur des souris issues des surplus d'élevage de notre établissement utilisateur destinées à être mises à mort. Ces souris pourront être génétiquement modifiées sans phénotype dommageable.

A ce jour, l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant le prélèvement sanguin pour la préparation de plaquettes non activées et leur études *ex vivo*. Ce projet sera réalisé en respectant les principes fondamentaux de l'expérimentation animale :

Remplacement : le modèle animal est fondamental dans notre cas, puisque le prélèvement sanguin pour la préparation de plaquettes non activées ne peut se faire que sur un organisme vivant entier. Raffinement : les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être et suivis avant et pendant l'expérimentation afin d'éviter au maximum la douleur et le stress au moment de l'expérimentation.

Tous les gestes se faisant sous anesthésie générale et les animaux étant suivis individuellement jusqu'à leur mort. Le suivi des animaux avant et pendant l'expérimentation sera effectué suivant des critères définis dans une grille de score clinique.

Réduction : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum nécessaire. Certains animaux utilisés seront issus du surplus de production.

**20360** Le tabac et l'alcool demeurent les deux causes principales de mort prématurée. Il existe également une forte prévalence de l'usage du tabac chez les patients souffrant de troubles du comportement alimentaire (TCA) avec une composante compulsive : la boulimie et l'hyperphagie boulimique. Ces troubles représentent également un enjeu de santé public majeur, sans aucun médicament validé. Un ensemble solide de données suggère que les TCA et les addictions au tabac et à l'alcool partagent des facteurs étiologiques. Cependant, il existe à ce jour une lacune dans la compréhension de ces liens.

L'objectif est de déterminer dans quelle mesure les addictions au tabac et à l'alcool et les TCA avec une composante compulsive partagent une étiologie impliquant les récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChRs). Une mutation dans un gène de ces récepteurs a notamment fait l'objet d'une recherche approfondie en raison de son association robuste avec l'addiction au tabac. De manière intéressante, cette mutation augmente aussi l'apparition de comportements addictifs pour l'alcool, et semble également augmenter l'appétence pour une nourriture particulièrement attrayante (sucrée), et être associée à la boulimie.

Enfin, un ensemble d'altérations comportementales et cognitives sont observées dans le cadre des TCA et des addictions, notamment des altérations du comportement social, dans lesquelles le rôle des nAChRs reste mal connu.

Nos objectifs sont de mieux caractériser l'impact des nAChRs sur les TCA et le comportement social, et de déterminer si et comment cet impact implique des mécanismes de passerelle entre addictions au tabac, à l'alcool et à la prise compulsive de nourriture.

Pour cela, i) nous étudierons de manière continue et en temps réel le comportement de rats et de souris transgéniques pour différents types de récepteurs nicotiques maintenus en groupes sociaux, ii) nous emploierons deux approches complémentaires pour mesurer le développement de la prise compulsive alimentaire chez des rats transgéniques pour différents types de récepteurs nicotiques, et iii) nous regarderons l'influence de la présence de troubles alimentaires de type compulsifs sur le développement de l'addiction à la nicotine et à l'alcool, toujours chez des rats transgéniques pour différents types de récepteurs nicotiques afin de comprendre l'impact de ceux-ci sur les liens entre ces pathologies.

Nous pourrions ainsi, en fonction des résultats obtenus, tenter de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces pathologies, en ciblant notamment le système cholinergique nicotinique. Nous anticipons l'utilisation de n=1216 rats, mâles et femelles, et de n=192 souris, mâles et femelles, âgés de 8 semaines à 12 mois. 5 procédures expérimentales seront utilisées dont 2 de classe légère (400 animaux) et 3 de classe modérée (1008 animaux). Cette étude ayant pour but de comprendre les circuits neurobiologiques qui sous-tendent des pathologies psychiatriques, il est impossible d'utiliser des modèles cellulaires et l'utilisation d'animaux mis en situation de tâches comportementales, où leur mode de prise de décision et leurs capacités cognitives peuvent être évaluées, est absolument requise. Nous réduirons au minimum possible (ni trop, ni trop peu, en utilisant les outils statistiques appropriés) le nombre d'animaux utilisés et prendrons toutes précautions pour éviter une souffrance psychologique et physique par l'utilisation de conditions optimales, au niveau de l'hébergement, du suivi et des soins. En particulier, nous prendrons en

charge la douleur et les altérations du bien-être potentiellement induites par les chirurgies par administration d'analgésiques et d'anesthésiques, par un suivi assidu des animaux en post-opératoire, y compris des zones de suture, en apportant les soins recommandés si des complications sont observées, et en mettant à mort les animaux si les points limites sont atteints. Aucun dommage autre qu'un stress transitoire n'est attendu concernant les expériences de comportement.

**20361** De nombreuses disciplines de la recherche biomédicale ont recours à l'utilisation de souris portant une ou plusieurs modifications génétiques. Certaines lignées portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène (lignées transgéniques) alors que d'autres sont déficientes pour un gène qui a été rendu inactif soit en permanence, soit sous l'effet d'un traitement chimique, soit sous l'effet d'un autre gène. Il existe actuellement plusieurs milliers de ces lignées de souris.

L'élevage des lignées doit être pris en charge par du personnel compétent, selon des règles strictes afin d'assurer le bien-être des animaux et d'ajuster le nombre d'animaux produits aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Pour ces raisons les élevages sont mutualisés au sein de l'établissement d'expérimentation animale concerné.

De nouvelles lignées présentant de nouvelles combinaisons de modifications génétiques peuvent être obtenues par croisements entre elles de lignées génétiquement modifiées existantes. Dans d'autres cas, la modification génétique peut être transférée par croisement successifs, sur ~5 à 10 générations, d'un fonds génétique donné dans un autre fonds car le phénotype peut varier en fonction du fonds génétique.

Ce projet concerne l'évaluation phénotypique de ces nouvelles lignées, à différents stades (naissance, sevrage et âge adulte) pour établir si ces animaux présentent ou non un phénotype dommageable et si c'est le cas élever ensuite cette lignée dans de bonnes conditions avec des points limites adaptés pour limiter le dommage au minimum.

Pour établir ces nouvelles lignées, des jeunes de différentes lignées parentales existantes sont accouplés entre eux et leurs descendants sont à nouveau accouplés entre eux ou avec une des lignées parentales. Le processus est répété jusqu'à l'obtention d'animaux porteurs de la nouvelle combinaison de modifications génétiques désirée (au minimum sur 2 générations) et/ou après ~5 à 10 générations dans le cas d'un changement de fonds génétique. Le génotype des jeunes à chaque étape doit être déterminé à partir d'une biopsie tissulaire. Les animaux ne possédant pas le génotype souhaité sont mis à mort dès le sevrage par une méthode autorisée. A chaque étape les animaux sont surveillés pour noter tout phénotype inhabituel. Le nombre d'animaux produits à chaque étape est limité au strict nécessaire pour obtenir les bons génotypes.

Une fois la nouvelle combinaison désirée obtenue, un phénotypage plus poussé est réalisé sur des animaux des 2 sexes et à 3 stades de développement : nouveau-nés, jeunes animaux sevrés et animaux adultes pour définir si la nouvelle lignée présente ou non un phénotype dommageable.

Dans la majorité des cas (~95%) ces nouvelles lignées ne présenteront pas de phénotype dommageable et leur élevage ne nécessitera ensuite pas d'autorisation de projet. Dans un certain nombre de cas (~5%) ces nouvelles lignées présenteront un phénotype dommageable et seront élevées avec des points limites adaptés pour réduire au maximum tout dommage aux animaux (la sévérité maximale atteinte sera modérée).

La nécessité de recourir à ces nouveaux modèles animaux est justifiée dans chacun des projets qui les utilisent ensuite.

Parmi les 600 lignées actuellement en élevage, environ 5% présentent un phénotype dommageable et sont élevées avec des points limites adaptés. Nous extrapolons qu'environ 5% des nouvelles lignées présenteront un phénotype dommageable et nécessiteront d'être élevées avec des points limites adaptés (la sévérité maximum atteinte sera modérée).

Cette activité conduira, en 5 ans, à la production d'environ 250 nouvelles lignées de souris qui seront utilisées ensuite dans plusieurs dizaines de projets autorisés.

L'ensemble de ce projet nécessitera de produire sur 5 ans, environ 49 225 animaux.

**20362** Notre laboratoire étudie depuis plusieurs années les ARN long non codants (lncARN). C'est une classe de molécules qui est retrouvée dans toutes les cellules vivantes. Ces molécules ont la particularité de ne pas coder pour des protéines, elles sont cependant impliquées dans la régulation de certains processus biologiques et la dérégulation de ces lncARN est associée à des maladies humaines tel que des cancers ou des maladies neurologiques. Malgré tout, les fonctions de nombreux lncARN restent inconnues.

Le système nerveux central accumule de grandes quantités de lncARN, ce qui suggère que les lncARNs ont un rôle primordial dans les réseaux neuronaux.

Pour identifier le rôle *in vivo* de ces lncARN notamment dans la neurogenèse (c'est-à-dire la formation d'un nouveau neurone à partir d'une cellule souche), nous utiliserons le poisson-zèbre comme modèle.

L'une des caractéristiques distinctives du cerveau du poisson zèbre (*Danio rerio*), par rapport aux mammifères, est sa neurogenèse qui se maintient au stade adulte dans plusieurs régions du cerveau. Cette neurogenèse se produit dans 16 différentes niches neuronales chez l'adulte. Cette importante neurogenèse permet au poisson zèbre de pouvoir régénérer son tissu cérébral même après de sévères lésions. Ces caractéristiques font du poisson zèbre un modèle de choix pour étudier les fonctions cérébrales et les capacités de régénération chez l'individu adulte.

L'objectif de notre étude, est d'étudier la fonction d'un lncARN particulier (lncRNA2.1) dans le maintien de cellules souches neurales et dans la régénération du cerveau adulte lésé. Nous avons choisi d'étudier ce gène car il est conservé entre notre espèce et le Poisson Zèbre. La conservation d'un gène est la présence d'homologies de séquence entre les espèces, ou une même position dans le génome (synténie) ou encore qu'il assure la même fonction. Pour notre gène il a été montré qu'il présentait des séquences génomiques identiques entre les deux espèces. C'est cette conservation entre les espèces qui en fait un gène d'intérêt et son implication déjà montrée dans le neuro-développement.

Pour ce faire nous utiliserons des poissons zèbre génétiquement modifiés n'exprimant plus notre lncRNA2.1 d'intérêt. Cette lignée transgénique ne présente pas de phénotype dommageable (animaux viables sans malformation et fertiles). Nous procéderons à une petite lésion dans le cerveau du poisson. Cette incision sera faite sur des poissons anesthésiés, par l'introduction d'une fine capillaire dans la cavité nasale du poisson. Grâce aux capacités de régénération du cerveau du poisson, 7 jours après cette procédure la lésion n'est plus visible. Ce modèle nous permettra de connaître les molécules impliquées dans ces processus de régénération du cerveau pour éventuellement en faire de nouvelles cibles thérapeutiques en vue de retarder son vieillissement.

Cette lésion nous permettra d'étudier les capacités de régénération du cerveau adulte et connaître l'impact de la perte de notre lncRNA2.1 sur ce mécanisme. Cette étude sera conduite sur 216 poissons.

Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

**Remplacement** : Les études sur lignées cellulaires permettent de répondre à certaines questions scientifiques, mais elles ne rendent pas compte des interactions complexes qui existent au sein d'un organisme entier. C'est pourquoi, en plus de nos études en cultures cellulaires, nous souhaitons poursuivre notre étude chez un animal modèle des vertébrés : le poisson zèbre. Nous avons choisi d'utiliser cette espèce inférieure, comme première étape de l'étude *in vivo* des lncARNs.

**Réduction** : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. C'est-à-dire pour cette procédure nous utiliserons 216 poissons

**Raffinement** : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. La procédure sera effectuée sur un animal anesthésié, et si l'animal présente des signes de souffrance à la suite de l'induction de la lésion l'expérimentation sera arrêtée. Les animaux seront suivis

quotidiennement afin d'assurer leur bien-être. Une grille de score a été établie pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux.

**20363** La radiothérapie est l'une des méthodes les plus efficaces et les plus utilisées pour traiter les cancers. Au moins 50% des patients atteints d'un cancer seront traités par radiothérapie durant leur maladie.

Le principal défi de la radiothérapie est de parvenir à déposer une dose suffisante pour traiter la tumeur (dose curative) tout en s'assurant que les tissus sains non tumoraux environnants soient préservés dans leur intégrité. Pour certains types de tumeurs radorésistantes 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 le cas des tumeurs intraoculaires, la notion de préservation des tissus sains est essentielle. Étant donné la petite taille de l'œil et la proximité des structures essentielles à la vision, comme le nerf optique et la macula, ces structures peuvent être fréquemment irradiées lors d'un traitement par radiothérapie de tumeur intraoculaire et altérer parfois sévèrement la vision du patient. Le mélanome uvéal, tumeur intraoculaire la plus fréquente chez l'adulte, en est un bon exemple : avec les techniques actuelles de radiothérapie, le contrôle tumoral est bon, mais les effets secondaires peuvent être graves : perte de la vision, forte augmentation douloureuse de la tension dans l'œil, ... Dans ce contexte, notre objectif principal s'inscrit dans l'amélioration des traitements de radiothérapie, notamment pour les tumeurs intraoculaires. Pour ce faire, nous explorons de nouvelles approches et nous proposons de développer des techniques innovantes utilisant de nouvelles modalités de traitement. Dans le cadre de ce projet, nous nous focaliserons sur des techniques d'irradiation innovantes qui ont montré dans des études préliminaires un intérêt significatif dans la préservation des tissus sains (même à des doses très élevées) ainsi qu'un effet très efficace sur le contrôle de la croissance tumorale chez le rat (porteur de gliome). Dans ce projet, nous évaluerons si le même incrément de l'indice thérapeutique (bon contrôle tumoral, faible toxicité) est aussi observé dans le cas des irradiations oculaires.

Remplacement :

Nos critères d'évaluation pour l'efficacité de la technique vont porter sur la préservation des tissus sains environnants la tumeur et sur le contrôle de la croissance des tumeurs irradiées. Aussi, le recours à des méthodes alternatives n'est pas envisageable dans ce projet et il nous est indispensable de développer des modèles animaux. Nous utiliserons dans ce projet des rongeurs (principalement des rats) dont l'anatomie de l'œil est globalement identique à celle de l'homme et la taille suffisamment grande pour y greffer des tumeurs et réaliser un traitement de radiothérapie par mini faisceaux.

Réduction :

Pour la réalisation de ce projet, 436 rats et 270 souris au maximum seront inclus dans des groupes de traitement comportant différentes doses et différentes configurations d'irradiation. Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement :

Notre projet va nécessiter de travailler sur des rats chez lesquels la taille plus importante de l'œil va être plus adaptée aux types d'irradiations proposées dans le cadre des procédures expérimentales. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress. Un suivi clinique régulier sera réalisé pour s'assurer du bien-être des animaux (suivi du poids rigoureux, mise en place de points-limites). Par ailleurs, l'ensemble du suivi ophtalmologique avant et après irradiation est réalisé de façon non-invasive et sur des animaux anesthésiés pour éviter toute douleur liée à ces examens.



**20364** Les histiocytoses sont des maladies rares affectant les histiocytes, des cellules dérivées des globules blancs qui assurent la défense des tissus dans lesquels elles se trouvent. On distingue trois grands types d'histiocytose : l'histiocytose bénigne de l'enfant, l'histiocytose des cellules de Langerhans (ou histiocytose langerhansienne) et l'histiocytose maligne.

L'histiocytose langerhansienne (HL) est la plus fréquente, avec une prédominance pédiatrique (environ 100 nouveaux cas par an en France).

Le tableau clinique est variable selon l'âge du patient et l'organe affecté, allant de lésions cutanées localisées à la dégradation de divers tissus. Tous les organes peuvent être atteints, avec par ordre de fréquence l'os (80 % des cas), la peau (33 %) et l'hypophyse (25 %). Les atteintes combinées de la rate, du foie et autres sites de production des cellules sanguines (définis comme les "organes à risques", OR+) concernent 10-15% des cas et touchent le jeune nourrisson, avec des manifestations cliniques sévères augurant un mauvais pronostic.

Grâce aux progrès dans le domaine du séquençage génétique, il a été montré que l'histiocytose langerhansienne était liée à la présence de mutations de gènes de la voie de signalisation des MAP-Kinases ouvrant ainsi la voie à de nouvelles possibilités d'investigation thérapeutique.

Le diagnostic des HL repose d'une part sur l'identification dans un tissu lésé de cellules pathologiques ayant les caractéristiques de cellules de Langerhans et d'autre part sur la mise en évidence de mutations de certains gènes de la voie de MAP-Kinases. Il a également été observé chez les patients HL OR+ qu'une partie des cellules sanguines possédait une mutation génétique retrouvée dans les histiocytes pathologiques.

Depuis 2015, la moitié des enfants présentant une HL OR+ dite sévère sont réfractaires au traitement de première ligne par vinblastine/corticoïde et sont traités par thérapie ciblée avec des molécules inhibitrices de BRAF, protéine mutée chez les patients HL OR+. Cependant, à l'arrêt du traitement, une récurrence survient dans la plupart des cas. Les enfants restent donc dépendants du traitement par thérapie ciblée qui ne peut être interrompu.

L'objectif du projet est de montrer que l'hématopoïèse (processus de production des cellules sanguines) des patients HL OR+ est le siège initial du développement de la pathologie et que l'efficacité variable des traitements utilisés est dépendante des sous-types cellulaires pathologiques affectés.

Pour cela, nous devons établir un modèle murin préclinique de la pathologie HL pour tester différentes thérapies et permettre une meilleure caractérisation des effets des traitements seuls ou en combinaison avec des chimiothérapies.

A terme, ces données permettront de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques pour traiter les histiocytoses langerhansiennes et éviter les récurrences.

L'établissement d'un modèle de xénogreffes d'étude préclinique sera réalisé. La prise des greffes sera évaluée à 2 et 4 mois par prélèvement sanguin. L'état clinique des modèles sera également évalué de façon rapprochée.

Une fois la pathologie développée, les xénogreffes seront suivies par imagerie scintigraphique et plusieurs combinaisons thérapeutiques seront administrées en fonction du stade de la pathologie, avec une analyse poussée des populations cellulaires sanguines et de la présence de la mutation du gène BRAF en fonction de la condition expérimentale testée.

Pour l'établissement du modèle de xénogreffe, nous utiliserons des souris immunodéficientes préalablement conditionnées pour la greffe par irradiation puis greffées avec les cellules pathologiques des patients.

Le nombre d'animaux (580 sur 5 ans) a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes. Il a été ajusté au minimum pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Ceux utilisés sont nés dans notre animalerie. Les protocoles expérimentaux seront effectués sous anesthésie générale pour éviter stress et douleurs aux animaux.

Les manipulations sur les souris seront effectuées par un ingénieur/chercheur spécialisé. Une anesthésie sera systématiquement réalisée pour les ponctions/ prélèvements. En cas de maladie sévère ne répondant pas au traitement, les souris seront sacrifiées en suivant les procédures adéquates. Afin de limiter la souffrance aux animaux, une surveillance rapprochée et l'utilisation d'antalgiques sont prévues. Des points limites ont été établis afin d'anticiper le sacrifice de l'animal si nécessaire. De plus, le milieu d'hébergement sera enrichi à l'aide de coton de nidification et de rouleaux en carton pour favoriser les cachettes et le jeu.

**20365** La peau est indispensable à la survie de l'organisme. Elle assure une fonction de barrière, de protection vis-à-vis de l'environnement extérieur, de régulation de la température corporelle et participe aux défenses immunitaires. Lors d'agressions comme une brûlure, la perte de l'intégrité de la peau induit un profond déséquilibre physiologique pouvant aller jusqu'au décès, en particulier lors de septicémie. En effet, la mort du patient brûlé est le plus souvent causée par une infection bactérienne. L'une des infections les plus fréquentes est celle causée par la bactérie *Staphylococcus aureus*. L'incidence des brûlures dans le monde est telle que de nombreux laboratoires cherchent de nouvelles stratégies thérapeutiques. En 2004, environ 11 millions de personnes étaient concernées.

Le plasma froid atmosphérique est un gaz ionisé avec une température proche de la température ambiante. Son application au domaine médical est un sujet en pleine expansion car le plasma est source d'espèces réactives qui agissent sur des cibles biologiques avec des effets bactéricides et favorisant la différenciation cellulaire, le développement tissulaire et l'angiogenèse. Les expériences *in vitro* et *ex vivo* que nous avons réalisées sur des cellules de la peau et des cellules de vaisseaux sanguins, ont donné des résultats positifs : le plasma stimule la prolifération et la migration des cellules *in vitro* mais aussi la création de nouveaux vaisseaux à partir de prélèvements de cellules de vaisseaux sanguins chez la souris. Par ailleurs, les expériences que nous avons réalisées chez la souris ont permis de mettre en évidence les effets antibactériens du plasma dans un modèle cutané traité par une greffe de peau autologue.

Notre objectif est de démontrer les effets antibactériens et anti-biofilms du plasma dans un modèle murin de brûlure cutanée traitée par une greffe de peau humaine, le traitement de référence pour les brûlures du troisième degré chez l'homme. Cette greffe sera ensuite infectée par *Staphylococcus aureus*. Nous testerons l'effet antibactérien du plasma mais aussi sa synergie avec des antibiotiques. Le projet comportera une seule procédure (sévérité élevée) et 8 conditions thérapeutiques.

Nous utiliserons des souris SCID immunodéficientes pour éviter le rejet de greffe à partir d'un greffon d'origine humaine. Les greffes seront infectées puis traitées une fois par jour. Le plasma froid sera utilisé seul ou en synergie avec la mupirocine ou le composé antibiotique NKI1 inhibant la NAD kinase de *S. aureus*. A J3, J7, et J13, l'effet des traitements sera analysé par numération bactérienne, microscopie électronique à balayage, microscopie confocale à balayage laser et immunohistochimie.

Il n'existe pas d'alternative à l'expérimentation animale pour cette étude. En effet, le plasma, en distribuant des espèces actives, agit non seulement sur les cellules cibles mais aussi sur l'équilibre moléculaire *in vivo* à la fois localement mais aussi de manière diffuse autour de la zone traitée. Afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation, la précision et la reproductibilité de la technique ont été validées précédemment sur des cellules cutanées isolées *in vitro*. De plus le protocole de brûlure ainsi que celui de la greffe ont déjà été mis en place et validés *in vivo* chez des souris lors d'un précédent projet. Toutefois, ce projet qui consistait en des greffes de peau autologues ne permettait pas d'observer les effets sur la peau humaine, celle-ci étant très différente de la peau de souris. Elles diffèrent en termes d'épaisseur et de nombre de cellules. Une autre différence majeure est la présence du panniculus carnosus dans le tissu sous-cutané murin, absent chez l'homme, influençant la biomécanique de la peau.

Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 10 animaux par condition, à raison de 8

conditions, analysés à 3 temps distincts soit un total de 240 souris SCID âgées de 6 semaines. Cette taille d'échantillon a été déterminée après analyse biostatistique. Une étude pilote sera également menée afin de valider les jours de mise à mort des souris ainsi que le jour de début de traitement. Elle permettra également d'observer si la différence de sexe engendre une différence significative. Cette étude pilote sera faite avec 24 souris. Au total, l'expérimentation utilisera donc 264 animaux. Nous nous attendons à une perte de 10% du nombre d'animaux (souris non résistantes à l'anesthésie générale ou possible infection au niveau des yeux observés lors de notre expérimentation précédente). Afin de juger de l'effet des traitements, un test de Student sera utilisé à condition que le test de normalité ne soit pas rejeté. Dans le cas contraire, un test non paramétrique de Mann-Whitney sera utilisé.

Le bien-être des animaux sera primordial durant toute l'expérimentation, notamment en assurant des phases d'acclimatation et un enrichissement de l'environnement. Afin de limiter la souffrance et l'angoisse des animaux, toutes les souris seront traitées par une greffe de peau, la zone lésée sera bandée et les souris bénéficieront de traitements complémentaires. De plus la procédure se déroulera sous anesthésie (locale et générale) et des analgésiques seront utilisés pour diminuer la douleur et apaiser les animaux. Un dérivé morphinique sera administré 2 fois par jour et un analgésique sera placé dans l'eau de boisson. Pendant 48 heures après la brûlure, une réhydratation des animaux par injection de solution de Ringer sera réalisée et des hydrogels seront disposés dans les cages afin de faciliter l'absorption d'eau. Enfin, des points limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée s'ils sont atteints, permettant ainsi d'assurer que la sévérité reste modérée. La surveillance des animaux sera journalière et les pansements des souris seront changés tous les jours.

**20366** *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* sont deux espèces bactériennes uniquement rencontrées chez l'homme et partagent la même porte d'entrée (le rhinopharynx). D'autres portes d'entrée sont possibles (par exemple la voie urogénitale). La présence de ces bactéries dans le rhinopharynx correspond à la situation de portage asymptomatique très fréquent dans la population générale (peut atteindre 10% pour le méningocoque). Cependant, ces bactéries peuvent aussi être (mais rarement) responsables de maladies graves chez l'homme (provoquant notamment des méningites et des septicémies). De ce fait, les infections invasives provoquées par ces bactéries constituent un défi en matière d'urgence en pathologie infectieuse car la balance entre portage et invasion est peu connue. Ces deux espèces peuvent partager des mécanismes physiopathologiques communs dont la compréhension peut profiter à la lutte contre ces infections. De plus, l'OMS a adopté en 2020 une feuille de route pour vaincre ces infections d'ici 2030. L'absence d'un modèle animal est un obstacle aux études de développement de stratégies curatives et préventives. Les modèles de cultures cellulaires ne permettent pas l'analyse complète de l'interaction complexe entre ces bactéries et l'organisme infecté et le passage entre le stade de portage et le stade d'invasion. L'utilisation des lapins est limitée à la production des anticorps permettant l'obtention des sérums polyclonaux utilisables dans les tests bactéricides standardisés. Cette standardisation n'est pas encore établie pour les autres méthodes alternatives aux lapins. Des souris transgéniques humanisées peuvent mimer certaines étapes de ces infections et peuvent donc contribuer aux études physiopathologiques ainsi qu'aux études des traitements curatifs et préventifs.

L'objectif de ce projet est d'utiliser le modèle souris développé lors d'un projet précédent pour poursuivre les travaux menés dans notre laboratoire sur le développement de candidats vaccins (études vaccinales précliniques et études de la virulence des bactéries résistantes aux antibiotiques). Ces modèles doivent permettre de réaliser des études *in vivo* des facteurs de virulence, une exploration des stratégies thérapeutiques et une analyse de la protection par des candidats vaccins. Trois candidats seront ciblés : le fHbp (factor H binding protein) et NHBA (*Neisserial heparin binding antigen*) du méningocoque et la Protéine P5 de *H. influenzae*.

Des souris (mâles et femelles) âgées de 8-12 semaines ont déjà été utilisées dans le projet précédent. Le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet est estimé à 860 (840 souris, 20 lapins).

Nous projetons d'utiliser des souris transgéniques (840 souris) exprimant certains gènes de l'homme et permettant ainsi de mimer la maladie chez la souris. Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet a été réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative (la taille d'échantillon a été déterminée après analyse biostatistique). L'utilisation du modèle souris sera réservée pour tester l'interaction entre la bactérie et l'hôte. Pour les expériences sur certains aspects bien identifiés de la virulence (adhésion aux cellules, induction de l'apoptose), les modèles de culture remplaceront l'animal. De plus, nous utiliserons l'imagerie dynamique. Cette approche permet de réduire le nombre de souris utilisées car le même animal est observé à chaque point de l'expérience et permet de raffiner l'expérience car l'animal ne subit aucun prélèvement invasif.

La procédure sera de sévérité modérée pour l'infection chez la souris. Le lapin (20 lapins) sera utilisé pour préparer des anticorps antibactériens et la procédure correspondant sera de sévérité légère. Le bien-être des animaux sera primordial durant toute l'expérimentation, notamment en assurant des phases d'acclimatation et un enrichissement de l'environnement. Des points limites ont été établis et entraîneront la mise à mort anticipée s'ils sont atteints, permettant ainsi de limiter la sévérité (traitement des blessures ou mise-à-mort des souris).

**20367** Le botulisme est une affection neurologique sévère, souvent mortelle si non traitée, qui le plus souvent est d'origine alimentaire. Le nombre annuel de cas humains en France est d'environ 20 à 40 et la plupart sont hospitalisés en service de réanimation et nécessitent des soins longs et lourds. Outre ces quelques cas, le risque avéré lié aux intoxications alimentaires nécessite une veille scientifique, le développement des techniques d'identification du botulisme ainsi que des contre-mesures sériques contre cet agent qui est aussi listé Catégorie A dans les risques de bioterrorisme. La méthode actuellement la plus sensible et spécifique capable de détecter et d'identifier l'ensemble des sérotypes de toxines botuliques est le test de létalité sur souris qui est considéré comme la méthode de référence. Du fait que la toxine botulique est présente en très faible concentration dans les prélèvements biologiques (de l'ordre de 1 dose létale sur souris dans le sérum des malades), seule cette méthode de référence permet la détection de la toxine botulique dans le diagnostic du botulisme humain et animal. Le botulisme est également une affection des animaux notamment volailles et bovins qui cause de lourdes pertes économiques chaque année en France.

Ce programme permettra l'étude et le développement de sérum équin et d'anticorps neutralisants des toxines botuliques à des fins de diagnostic et pour développer des applications à visée thérapeutique. Ce projet permettra également de réduire le risque biologique dans les sociétés civiles grâce à une coopération plus solide entre laboratoires experts et l'amélioration de nos méthodes de détection. Le modèle reconnu d'évaluation du potentiel neutralisant des sérums et anticorps anti-toxines botuliques est le test de protection chez la souris contre une dose d'épreuve de toxine botulique. Le test de létalité sur souris est utilisé pour calibrer l'activité des toxines botuliques et pour évaluer le titre protecteur des sérums ou anticorps anti-toxines botuliques dans des essais de neutralisation avec des doses connues (DL50) de toxines botuliques.

Le nombre total d'animaux permettant ces différentes études sur la période du projet sera de 4560 souris au maximum. Il s'agit de groupes de souris mâles adultes de moins de 5 g de différence âgées de 4 à 7 semaines à leur arrivée. Ce choix d'animaux obéit à des impératifs d'harmonisation strictes avec nos partenaires européens pour la certification des standards de toxines botuliques ainsi que pour la qualification des candidats anticorps ou sérums. Nous devons donc suivre un protocole très strict y compris concernant les caractéristiques des animaux, leur sexe et leur poids. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin de garantir une bonne reproductibilité des résultats, tout en respectant le principe des 3Rs (réduction, raffinement, remplacement). Notamment, en ce qui concerne l'évaluation des titres neutralisants des sérums, les effectifs ont été validés afin de garantir la qualité des contrôles réalisés. Nous mettons actuellement en place un large éventail de méthodes de remplacement dans le cadre de l'ensemble de projets européens collaboratifs pour la détection et l'identification des toxines botuliques, mais ces méthodes doivent être validés par rapport à la méthode de référence qui reste le test de létalité

sur souris qui fait l'objet de cette demande. Les alternatives non animales disponibles sont en cours d'évaluation : il s'agit de méthodes ELISA détectant les toxines botuliques à l'aide d'anticorps spécifiques, de tests bandelettes, de méthodes de détection du clivage des protéines cibles, méthode *ex vivo* de paralysie de l'hémidiaphragme ou de méthodes de spectrométrie de masse couplées au test de clivage.

La méthode de réduction appliquée est l'emploi du plus faible nombre de souris possible afin d'atteindre un coefficient de variation proche de 20%. Les méthodes alternatives n'ont pas encore franchi toutes les étapes de validation par rapport à la méthode de référence, notamment en ce qui concerne les seuils de détection de toxines. Des efforts sont encore nécessaires pour un minimum de 5 ans afin de mettre au point les méthodes *in vitro* et identifier des contremesures efficaces. Nous avons toutefois développé les tests ELISA pour mesurer les principaux sérotypes de toxines botuliques mais ces tests ne mesurent pas l'activité neurotoxique réelle de la toxine. Ces tests nous ont permis toutefois de réduire drastiquement le nombre d'animaux utilisés pour la mise en place des tests inter-laboratoires et pour la préparation des échantillons à envoyer aux partenaires. Nous avons aussi réduit au strict minimum le nombre de souris utilisées pour les tests de comparaison des méthodes. Enfin, une méthode de détection de l'activité des neurotoxines sur neurones dérivé de cellules souches pluripotentes humaines inductibles «h-iPSC » sera développée car seule ce type de méthode permettra de prendre en compte toutes les étapes du processus d'intoxication et sensibilité particulière de cellules humaines aux sérotypes de toxines botuliques.

Le projet comprend 3 procédures sévères. Afin de raffiner le test au maximum, les animaux sont observés quotidiennement au cours des tests afin de réduire les risques de souffrance et ceux présentant des signes de paralysie suite à l'injection de toxines botuliques sont mis à mort. Nous avons identifié des critères précoces notés sur la feuille d'observation qui nous permettent de prévoir quelle souris risque de souffrir et donc programmer sa mise à mort rapide. Des mesures d'amélioration des conditions de vie des souris ayant du mal à se déplacer après l'injection ont été mises en place (cotons imbibés d'eau et nourriture en gel placés dans la cage ainsi que chauffage de la cage après les injections).

**20368** Le tube digestif de l'homme et de nombreuses espèces animales renferme un grand nombre de microbes – principalement des bactéries, mais aussi des virus, des parasites, des champignons ou des levures – qui constituent le microbiote intestinal.

Ces microbes, résidents normaux de l'environnement digestif ou seulement en transit avec l'aliment, interviennent dans les fonctions digestives et physiologiques générales de l'organisme. *Candida albicans* est une levure commensale facultative du tube digestif de l'homme, normalement inoffensive quand elle est présente en faible quantité au sein du microbiote intestinal. Les facteurs qui contrôlent la colonisation intestinale à *C. albicans* sont mal connus. Dans des conditions de stress, *C. albicans* peut proliférer et se transformer en véritable pathogène responsable d'infections généralisées parfois mortelles chez des individus fragilisés (patients hospitalisés, jeunes enfants, individus avec des déficits de leur immunité). Par ailleurs, *C. albicans* est également responsable du muguet buccal et de la majorité des mycoses vaginales. En effet, la plupart des femmes souffrent d'au moins un épisode de candidose vulvo-vaginale (CVV) au cours de leur vie, et pour certaines (~ 8%) de candidoses vaginales récurrentes (plus de 4 épisodes par an).

L'objectif principal de ce projet est d'étudier les facteurs de virulence de *C. albicans* qui contribuent au maintien d'un haut niveau de colonisation intestinale chez l'hôte et à la survenue d'infections vaginales ou systémiques. Nous inoculerons des souris soumises à des facteurs de stress (produits chimiques), comme des antibiotiques, des hormones ou des immunosuppresseurs afin d'analyser d'une part, les différentes étapes de la colonisation intestinale par *C. albicans* et de la survenue d'infections vaginales ou systémiques et d'autre part, leur impact sur l'évolution des génomes de *C. albicans* dans le tractus gastro-intestinal ou vaginal.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension de la biologie et de la pathogénicité de *C. albicans*, principale espèce fongique responsable d'infections chez l'homme. Le but à plus

long terme est de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour limiter ou empêcher la colonisation digestive ou vaginale puis les infections à *C. albicans* chez les patients à risque.

Les effets néfastes attendus pour les animaux sont le plus souvent limités. Les animaux pourront avoir de la diarrhée et maigrir. Le niveau de sévérité attendu est modéré pour le modèle de colonisation digestive ou vaginale par *C. albicans*. Pour les animaux où nous devons causer des infections par injection intraveineuse de levures, qui peuvent entraîner le décès des souris en quelques jours du fait du sepsis, nous avons établi des points limites et une stratégie d'observation qui nous permettront d'intervenir de manière anticipée pour limiter cette sévérité au stade modéré. Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3R –Remplacement, Réduction, Raffinement.

Le recours à l'animal est indispensable car le microbiote digestif est très complexe tant dans sa composition que dans son aspect dynamique et ne peut pas être reproduit de façon adéquate *in vitro*. Les tests préalables que nous avons réalisés *in vitro* et ex-vivo sur des lignées cellulaires nous ont permis d'identifier certains facteurs de virulence chez *C. albicans*. Leur implication dans la capacité de *C. albicans* à coloniser le tube digestif et causer des infections systémiques ne peut désormais être appréhendée que chez l'animal, en modulant son microbiote intestinal et/ou son immunité naturelle.

Le projet comprend donc 4 procédures de sévérité modérée et le nombre de souris nécessaires a été évalué à un maximum de 1166. Les souris seront hébergées par groupe de 5 au maximum avec du matériel d'enrichissement dans la cage. L'utilisation de points limites adaptés et de critères d'arrêt des souffrances seront mis en oeuvre pour chaque procédure. Lorsque des souris seront immunodéprimées, elles seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection avec d'autres germes pathogènes. Nous avons préalablement consulté un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé et permettre une analyse statistique des résultats (tests non paramétriques - Chi<sup>2</sup> et test de Mann et Whitney- adéquat pour les petits effectifs, courbe de survie, en fonction des paramètres étudiés).

**20369** La pandémie due au SARSCov-2 qui sévit encore sur la planète a fait connaître au grand public la réanimation et notamment la réanimation respiratoire. En effet cette pandémie génère des formes graves de COVID-19 qui sont liées à une insuffisance respiratoire aiguë appelée syndrome de détresse respiratoire aiguë (SDRA). Le SDRA nécessite une prise en charge spécifique et précise basée sur l'identification et le traitement de la cause et la ventilation mécanique. Ceci consiste en une assistance respiratoire par un ventilateur mécanique par le biais d'une sonde d'intubation trachéale. Il est bien connu qu'une telle ventilation mécanique est artificielle, non physiologique, et de ce fait peut endommager le poumon apportant ainsi des lésions supplémentaires à celles liées à l'agression initiale. Ces lésions liées à la ventilation mécanique sont dues à un excès de volume d'air apporté par le ventilateur. Cet excès d'air va, notamment en fin d'inspiration, augmenter les contraintes mécaniques sur les tissus pulmonaires. Pour le combattre, le réglage du volume courant délivré par le respirateur doit être finement ajusté. En effet, la réduction du volume courant a permis de réduire la mortalité des patients atteints de SDRA. Cette mortalité reste cependant élevée, en partie en raison des effets adverses de la ventilation mécanique.

Par ailleurs, la ventilation est un phénomène cyclique, succession de l'inspiration et de l'expiration. Au cours du SDRA une partie du poumon est ventilée normalement, une partie ne l'est pas ou peu, et une partie l'est en fin d'inspiration mais se vide complètement d'air en fin d'expiration. Ce processus cyclique d'ouverture-fermeture des alvéoles pulmonaires génère une inflammation surtout dans les régions du poumon où coexistent des zones non ventilées et des zones qui s'ouvrent et se ferment. Pour tenter de réduire ce processus, une pression expiratoire positive peut être appliquée sur le respirateur, minimisant l'amplitude des ouvertures-fermetures cycliques. Mais il n'existe actuellement pas de preuve scientifique qu'une pression expiratoire haute ou basse, ou bien réglée selon des critères précis de nature physiologique, permette de réduire la mortalité des patients atteints de SDRA.

Une protection supplémentaire des poumons au cours de la ventilation mécanique pour SDRA peut être obtenue en plaçant les sujets sur le ventre (décubitus ventral). Cette manœuvre permet une distribution plus homogène du stress pulmonaire, et s'est avérée capable de réduire la mortalité des patients avec SDRA. Elle fait l'objet d'une recommandation forte et son utilisation au cours du COVID a été très large.

Les lésions pulmonaires induites par la ventilation mécanique procèdent d'une altération de la matrice extra-cellulaire pulmonaire, squelette du poumon composé d'un maillage de fibres (élastine, collagène), d'eau et de macromolécules. Leur altération secondaire à un excès de contrainte mécanique pulmonaire contribue aux lésions pulmonaires et à l'inflammation entraînées par la ventilation mécanique injurieuse/agressive.

L'intérêt scientifique de ce projet est de déterminer quels éléments de la matrice extracellulaire sont abimés par la ventilation mécanique. Cette compréhension est importante pour mettre en place des stratégies préventives ou thérapeutiques contre les effets adverses de la ventilation mécanique. La base structurale des propriétés viscoélastiques du poumon n'est pas clairement déterminée. Le rôle de ces propriétés au cours dans le SDRA est également peu clair car peu étudié. La matrice extracellulaire est altérée sans que l'on sache si ces altérations sont la cause ou la conséquence du SDRA et/ou de la ventilation mécanique. La relation entre ces propriétés et des données concernant les altérations structurales au cours du SDRA et de la ventilation mécanique manquent. La réponse à ces questions est l'objectif du présent projet de recherche expérimental sur 48 rats adultes.

Application 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 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).
- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Toutes les mesures seront prises afin de réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse des animaux, notamment en maintenant des conditions de stabulation (température, lumière, densité de population, alimentation) optimales ; en instaurant une sédation avant l'induction de l'anesthésie générale ainsi qu'une antalgie efficace par une anesthésie profonde. Le milieu des animaux sera enrichi.
- Remplacement : Etant donné la complexité du système respiratoire, il n'est actuellement pas possible de remplacer le modèle animal par un modèle *in vitro*. Cependant, le recours au modèle animal est justifié par le bénéfice qu'apportera la connaissance des cibles thérapeutiques potentielles au sein de la matrice extra-cellulaire, chez l'homme.

**20370** Dans la moelle osseuse est fabriquée une cellule dite "souche hématopoïétique". Ces cellules souches hématopoïétiques (CSH CD34+) sont essentielles à la vie. Elles possèdent la capacité d'assurer un renouvellement régulier, des différentes cellules du sang. La chimiothérapie, utilisée pour traiter le cancer, affaiblit considérablement le corps et le système immunitaire. Par conséquent, le patient devient plus vulnérable aux infections et sa survie est menacée. Pour faire face, à cet inconvénient, il est possible d'effectuer des greffes de cellules souches hématopoïétiques, propres au patient ou provenant d'un autre donneur. Cependant, il existe des risques, soit de récurrence du cancer, soit de rejet de la greffe.

Objectif : Ce projet préclinique, apporte une alternative à l'étape de greffe, pour améliorer la survie des patients. Il vise à valider de nouveaux outils qui permettent de rendre les CSH CD34+ résistantes aux chimiothérapies. Seules les cellules modifiées pourront survivre et reformer les populations cellulaires du sang.

Modalités techniques : Le modèle animal choisi est la souris qui est greffé avec des CSH et fabrique toutes les cellules sanguines. Dans un premier temps, nous injecterons l'un de nos outils dans la

moelle osseuse de la souris. Ensuite, nous chercherons à sélectionner les cellules qui sont modifiées, en traitant les souris avec une chimiothérapie. Les cellules résistantes développent après toutes les cellules du sang. Ce projet est divisé en quatre procédures : une d'élevage et trois procédures expérimentales.

Coûts/bénéfices : Ces traitements sont sans conséquence néfaste pour les animaux. Un suivi régulier des signes généraux cliniques, tels que l'état du pelage, la prostration, le comportement et le poids de l'animal sera réalisé deux fois par semaine, afin de veiller au bien-être des animaux. Ce projet permettra d'obtenir de nombreuses informations sur la repopulation de l'organisme avec les différentes cellules du sang, grâce aux CSH modifiées et résistante à la chimiothérapie.

La validation de nos outils en rongeur est essentielle avant de les tester chez le gros animal et l'homme. Conformément aux exigences de remplacement (R1), il n'existe pas de méthodes alternatives pour suivre le devenir de nos cellules humaines après modification *in vivo* et attester du caractère souche de ces cellules.

Conformément aux exigences de réduction (R2), nous cherchons à limiter le nombre de souris utilisées par des expériences mises en place au laboratoire pour valider d'abord nos outils. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés par groupe, tout en garantissant des résultats statistiquement robustes, nous avons utilisé le logiciel de prédiction statistique (GPower) (R2). Si l'on atteint le nombre suffisant de souris/groupe pour une analyse statistiquement correcte on arrêtera les procédures. La procédure 2, nous permettra de diminuer les groupes expérimentaux de 5 à 3 car seuls les 3 outils les plus performant seront évalués, dans la procédure 3 et 4. Toute douleur, souffrance, angoisse pouvant être ressenties par l'animal seront limitées par l'application des points limites précis et adaptés.

Ce projet prévoit l'utilisation de 2178 animaux et est financé par des organismes de recherche publique.

## **20371** CONTEXTE DU PROJET :

Chaque année, environ 1500 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chez des enfants en France. Parmi ces cancers, le neuroblastome touche les très jeunes enfants et est responsable d'un décès sur six parmi les cancers pédiatriques. Les tumeurs se développent à partir de la médullo-surrénale (glande au-dessus du rein) ou de ganglions nerveux sympathiques situés de chaque côté de la colonne vertébrale. Le neuroblastome se caractérise par une grande hétérogénéité dans sa présentation clinique ainsi que dans son évolution. Deux grands types de maladie peuvent être distingués, dits de bas risque ou de haut risque. Les formes de haut risque sont fréquemment associées à des rechutes et à un pronostic sombre. Le taux de survie pour ces formes graves demeure inférieur à 40%, malgré l'utilisation de traitements lourds associant chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie et traitement de consolidation.

Pour mieux comprendre la maladie et proposer de nouveaux traitements plus efficaces, il est nécessaire de caractériser les mécanismes mis en jeu par les cellules cancéreuses dans le neuroblastome, en s'intéressant à l'hétérogénéité génétique et non-génétique des cellules tumorales ainsi qu'au rôle des cellules du microenvironnement. Nous utilisons une collection de lignées cellulaires de neuroblastome établies *in vitro* à partir de tumeurs de patients. Ces lignées sont caractérisées au niveau génomique, transcriptomique et épigénétique et sont manipulées par différentes approches afin de disséquer les mécanismes de l'oncogenèse. Nous disposons aussi de données obtenues sur des tumeurs de patients. L'ensemble de ces données sont intégrées afin de formuler des hypothèses qui doivent ensuite être évaluées dans des modèles précliniques de la maladie.

### OBJECTIFS ET AVANTAGES DU PROJET :

Pour étudier la maladie, il est indispensable de disposer de modèles précliniques pertinents *in vivo*. Pour ce faire, nous utilisons plusieurs types de modèles chez la souris :

- des animaux génétiquement modifiés (présentant des altérations équivalentes à celles présentes dans les tumeurs des enfants)



- des souris greffées avec des échantillons de tumeurs de patients (Modèles PDXs, pour « Patient-Derived Xenografts »).

- Des souris injectées en sous-cutané avec des lignées de cellules humaines pour évaluer leur potentiel tumorigénique.

- Les différents modèles (lignées cellulaires, PDXs ou souris génétiquement modifiées) sont mis à profit pour tester diverses molécules ou combinaisons de molécules en termes d'efficacité thérapeutique ou d'impact sur différentes propriétés des cellules tumorales. La variation du volume tumoral permet en effet de rapidement déterminer l'activité anti-tumorale d'un médicament.

L'étude de la dissémination métastatique des cellules de neuroblastome est cruciale pour comprendre un des processus qui reste l'une des causes de mortalité majeure chez ces patients. Nous utiliserons plusieurs stratégies pour étudier la capacité de différents modèles de neuroblastome à former des métastases. D'une part, nous prévoyons d'implanter la tumeur ou des lignées cellulaires en sous-cutanée ou de manière orthotopique, c'est-à-dire dans la glande surrénale de la souris afin de mimer le contexte physiologique des neuroblastomes se développant à partir de la glande surrénale chez le patient ou alors d'effectuer des injections de cellules tumorales par voie intraveineuse. Pour l'étude des métastases après formation d'une tumeur primaire en sous-cutané, des résections des tumeurs au plus tard à taille éthique seront effectuées afin de garder les animaux en vie plus longtemps et favoriser le développement de métastases à distance du site de la tumeur primaire.

**3R (REPLACER, RÉDUIRE, RAFFINER):**

**Remplacement :** Pour étudier l'hétérogénéité intra-tumorale, l'identité des cellules de neuroblastome *in vivo* et les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement il est nécessaire d'utiliser des modèles pré-cliniques pertinents de la maladie, en particulier chez la souris, organisme vivant intégré et autonome et mammifère présentant de nombreuses similitudes avec l'homme. L'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques ne peut se limiter à des expériences *in vitro* (mesure d'IC50 sur des lignées tumorales) et à l'analyse des données obtenues sur les tumeurs de patients (caractérisation des profils transcriptomiques par RNA-seq au niveau cellules uniques, définissant les différentes populations cellulaires de la tumeur). Cette évaluation requiert l'utilisation de modèles murins reproduisant au mieux la complexité de l'écosystème tumoral, incluant cellules tumorales et cellules du microenvironnement, avant d'envisager des tests chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques.

**Réduction :** Pour l'ensemble du projet, le nombre maximum de souris nécessaire est de 4817 souris sur une période de 5 ans. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. Les tests préliminaires *in vitro* permettent de limiter le nombre de molécules à tester sur les souris. De plus, une partie des souris, n'ayant pas le bon génotype pour ce projet seront utilisées pour des tests de toxicité ou dans un autre projet au sein de notre équipe.

**Raffinement :** En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis régulièrement afin d'assurer leur bien-être. Une grille de score sera mise en place pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

**20372** Les traitements endoscopiques ayant pour but de retirer les tumeurs superficielles digestives, sont une excellente alternative à la chirurgie. De par leur voie d'abord (utilisation de la voie naturelle digestive supérieure), ils ont en comparaison à la chirurgie, une morbidité et une mortalité bien moins importante. Nous pouvons par exemple citer les tumeurs superficielles de l'oesophage qui peuvent être réséquées de façon mini-invasives par endoscopie alors que la chirurgie (oesophagectomie) est associée à une mortalité variant de 5 à 12% en fonction de l'expertise du centre. Les techniques endoscopiques de référence sont la mucosectomie (résection avec une anse diathermique), et une plus récente appelée « dissection sous muqueuse » (DSM) qui présente d'excellents résultats carcinologiques. La complication la plus grave de ces techniques est la

perforation lors de la résection endoscopique. Le taux de perforation diminue de façon très importante avec le nombre de procédures réalisées. Une limite de la DSM est la longueur de la courbe d'apprentissage et un nombre minimum de procédures doivent être réalisées chez l'animal avant de commencer le traitement chez l'homme. Ce projet est développé dans le respect de la règle des 3 R. 1/Remplacer : Le porc charcutier, par ses similitudes anatomiques et histologiques est un excellent modèle expérimental de résection endoscopique des tumeurs, reconnu et validé dans la littérature scientifique. Les techniques endoscopiques utilisées sont les mêmes que pour l'Homme et la reproductibilité est optimale chez le porc, permettant l'apprentissage et la maîtrise de la technique. Chaque participant devra au préalable avoir un niveau d'endoscopie suffisant pour avoir accès à la formation sur animal vivant ceci grâce à un entraînement sur des modèles de simulation endoscopique organique (estomac de porc ou colon de vache *ex vivo*) ou sur simulateur électronique. 2/Réduction: Notre projet est d'organiser des sessions de formation à la dissection sous-muqueuse pour la résection des tumeurs de l'oesophage et de l'estomac. L'objectif est de savoir parfaitement utiliser tout nouveau matériel pour la résection et pour traiter les complications. Pour réduire le nombre d'animaux, des formations préalables sur modèle de simulation seront réalisées, notamment pour l'apprentissage de l'utilisation du matériel. Nous prévoyons d'utiliser 150 porcs sur 5 ans (10 séances/an, 3 porcs/séance, durée=5 ans). Nous pensons que 5 années (soit 50 séances au total) sont nécessaires pour pouvoir former correctement 50 gastro-entérologues et atteindre un niveau technique suffisant avant de passer chez l'homme. Il est prévu 3 porcs sur la journée de formation (6-8h) sur lesquels 2 chirurgiens gastroentérologues déjà expert en endoscopie vont s'entraîner 3/ Raffinement: Les animaux seront pris en charge au laboratoire et anesthésiés pour les procédures avant d'être mis à mort à la fin de la séance d'entraînement. Devant tout signe de souffrance nous adapterons la procédure (exsufflation si trop d'air dans l'estomac ou majoration du traitement antalgique). Le traitement antalgique sera réévaluer tout au long de la procédure.

### **20373 CONTEXTE DU PROJET :**

Chaque année, environ 1500 nouveaux cas de cancers sont diagnostiqués chez des enfants en France. Parmi ces cancers, le neuroblastome touche les très jeunes enfants et est responsable d'un décès sur six parmi les cancers pédiatriques. Les tumeurs se développent à partir de la médullo-surrénale (glande au-dessus du rein) ou de ganglions nerveux sympathiques situés de chaque côté de la colonne vertébrale. Le neuroblastome se caractérise par une grande hétérogénéité dans sa présentation clinique ainsi que dans son évolution. Deux grands types de maladie peuvent être distingués, dits de bas risque ou de haut risque. Les formes de haut risque sont fréquemment associées à des rechutes et à un pronostic sombre. Le taux de survie pour ces formes graves demeure inférieur à 40%, malgré l'utilisation de traitements lourds associant chimiothérapie, chirurgie, radiothérapie et traitement de consolidation.

Pour mieux comprendre la maladie et proposer de nouveaux traitements plus efficaces, il est nécessaire de caractériser les mécanismes mis en jeu par les cellules cancéreuses dans le neuroblastome, en s'intéressant à l'hétérogénéité génétique et non-génétique des cellules tumorales ainsi qu'au rôle des cellules du microenvironnement. Nous utilisons une collection de lignées cellulaires de neuroblastome établies *in vitro* à partir de tumeurs de patients. Ces lignées sont caractérisées au niveau génomique, transcriptomique et épigénétique et sont manipulées par différentes approches afin de disséquer les mécanismes de l'oncogenèse. Nous disposons aussi de données obtenues sur des tumeurs de patients. L'ensemble de ces données sont intégrées afin de formuler des hypothèses qui doivent ensuite être évaluées dans des modèles précliniques de la maladie.

### **OBJECTIFS ET AVANTAGES DU PROJET :**

Pour étudier la maladie, il est indispensable de disposer de modèles précliniques pertinents *in vivo*. Pour ce faire, nous utilisons plusieurs types de modèles chez la souris :

- des animaux génétiquement modifiés (présentant des altérations équivalentes à celles présentes dans les tumeurs des enfants)

- des souris greffées avec des échantillons de tumeurs de patients (Modèles PDXs, pour « Patient-Derived Xenografts »).

- Des souris injectées en sous-cutané avec des lignées de cellules humaines pour évaluer leur potentiel tumorigénique.

- Les différents modèles (lignées cellulaires, PDXs ou souris génétiquement modifiées) sont mis à profit pour tester diverses molécules ou combinaisons de molécules en termes d'efficacité thérapeutique ou d'impact sur différentes propriétés des cellules tumorales. La variation du volume tumoral permet en effet de rapidement déterminer l'activité anti-tumorale d'un médicament.

L'étude de la dissémination métastatique des cellules de neuroblastome est cruciale pour comprendre un des processus qui reste l'une des causes de mortalité majeure chez ces patients. Nous utiliserons plusieurs stratégies pour étudier la capacité de différents modèles de neuroblastome à former des métastases. D'une part, nous prévoyons d'implanter la tumeur ou des lignées cellulaires en sous-cutanée ou de manière orthotopique, c'est-à-dire dans la glande surrénale de la souris afin de mimer le contexte physiologique des neuroblastomes se développant à partir de la glande surrénale chez le patient ou alors d'effectuer des injections de cellules tumorales par voie intraveineuse. Pour l'étude des métastases après formation d'une tumeur primaire en sous-cutané, des résections des tumeurs au plus tard à taille éthique seront effectuées afin de garder les animaux en vie plus longtemps et favoriser le développement de métastases à distance du site de la tumeur primaire.

**3R (REMPACER, RÉDUIRE, RAFFINER):**

**Remplacement :** Pour étudier l'hétérogénéité intra-tumorale, l'identité des cellules de neuroblastome *in vivo* et les interactions entre cellules tumorales et microenvironnement il est nécessaire d'utiliser des modèles pré-cliniques pertinents de la maladie, en particulier chez la souris, organisme vivant intégré et autonome et mammifère présentant de nombreuses similitudes avec l'homme. L'évaluation de nouvelles approches thérapeutiques ne peut se limiter à des expériences *in vitro* (mesure d'IC50 sur des lignées tumorales) et à l'analyse des données obtenues sur les tumeurs de patients (caractérisation des profils transcriptomiques par RNA-seq au niveau cellules uniques, définissant les différentes populations cellulaires de la tumeur). Cette évaluation requiert l'utilisation de modèles murins reproduisant au mieux la complexité de l'écosystème tumoral, incluant cellules tumorales et cellules du microenvironnement, avant d'envisager des tests chez l'Homme dans le cadre d'essais cliniques.

**Réduction :** Pour l'ensemble du projet, le nombre maximum de souris nécessaire est de 4817 souris sur une période de 5 ans. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. Les tests préliminaires *in vitro* permettent de limiter le nombre de molécules à tester sur les souris. De plus, une partie des souris, n'ayant pas le bon génotype pour ce projet seront utilisées pour des tests de toxicité ou dans un autre projet au sein de notre équipe.

**Raffinement :** En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront suivis régulièrement afin d'assurer leur bien-être. Une grille de score sera mise en place pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance.

**20374** Le sommeil est un processus physiologique qui a longtemps été considéré comme un phénomène passif, alors qu'une véritable activité cérébrale a lieu lors de ses différentes phases, participant au bon fonctionnement de l'ensemble de l'organisme. Il permet notamment la consolidation de la mémoire mais joue également un rôle vital dans le maintien des fonctions physiologiques, par exemple en assurant l'élimination des toxines accumulées lors des phases de veille. Le manque de sommeil ou l'altération de sa qualité, qui affecte 30 à 35% de la population générale, sont des facteurs de risque des maladies cardiovasculaires, du diabète, des troubles anxieux et même de démence. Par ailleurs, les troubles neurodégénératifs, dont l'incidence est croissante du fait, notamment, du vieillissement de la population, sont fréquemment associés à des troubles du

sommeil. Chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer, les perturbations du rythme veille-sommeil sont corrélées avec la sévérité des troubles cognitifs. 60 à 70% des patients parkinsoniens présentent, quant à eux, des insomnies associées à une désorganisation de l'architecture du sommeil et des endormissements diurnes irrépessibles. Ces troubles du sommeil seraient d'ailleurs un marqueur diagnostique précoce de ces maladies avec une apparition antérieure de quelques années aux troubles cognitifs. On comprend alors que, dans ce contexte, le développement de thérapies dans cette thématique soit un enjeu de santé publique.

Pouvoir proposer une évaluation par des mesures fiables et quantitatives des perturbations des cycles veille/sommeil ainsi que de l'alternance des différentes phases est donc essentiel dans un processus de développement préclinique pour un futur médicament. Nous proposons, dans ce projet, de développer en premier la méthodologie et les outils technologiques au sein de notre structure permettant de quantifier les différents stades de sommeil. Pour ce faire, nous utiliserons des enregistrements électroencéphalographiques couplés à des enregistrements électromyographiques pour définir les différentes phases du sommeil et d'éveil et leur enchaînement. Notre but sera ensuite d'évaluer l'effet de molécules en développement sur ces paramètres et leur potentiel thérapeutique.

Pour ce projet, nous allons utiliser 40 lots de 16 rats, soit 640 animaux.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

**Remplacement :** Ce projet a pour but de mesurer l'effet de composés sur les états de veille et de sommeil, or le sommeil ne peut s'étudier que dans les conditions *in vivo* chez l'animal entier. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes neurophysiologiques durant différents états de vigilance.

**Réduction :** Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet et la validité des expériences qui seront menées.

**Raffinement :** Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions physiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition *sine qua non* de chaque étape de l'expérimentation. Le projet implique la mise en place d'un système d'enregistrement électroencéphalographiques et d'un système d'enregistrement électromyographiques 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. 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.

**20375** Malgré les progrès remarquables réalisés au cours de la dernière décennie dans la compréhension, la prévention et le traitement du cancer, les métastases demeurent la principale raison pour laquelle les patients atteints de cancer succombent à leur maladie. Il est devenu clair que de nombreux aspects de ce processus, y compris les mécanismes initiateurs de la dissémination métastatique, sont encore inconnus. Les traitements anticancéreux actuels ciblent principalement les cellules malignes, mais de multiples études précliniques ont montré que la chimiothérapie peut favoriser les métastases. Il y a donc un besoin non satisfait de nouvelles stratégies de lutte contre le cancer avec des mécanismes fondamentalement distincts fondés sur une solide compréhension du processus de la maladie métastatique. Avec 60 000 nouveaux cas en France tous les ans, le cancer de la prostate représente aujourd'hui la première cause de mortalité chez l'homme après 70 ans. On compte actuellement 9 000 décès par an pour ce cancer qui touche 1 homme sur 8. Actuellement, le Docetaxel est le traitement de référence des cancers de la prostate métastatiques résistants au traitement hormonal (CRPC). Cette chimiothérapie apporte un réel bénéfice au niveau de la survie

des malades. Malheureusement, on sait qu'une grande partie des malades traités par ce médicament développent une résistance à la chimiothérapie. C'est pourquoi aujourd'hui, l'enjeu majeur consiste à trouver à la fois des méthodes pour prédire cette résistance et de nouvelles combinaisons de traitements pour surmonter cette résistance et éviter les traitements inutiles et toxiques. Ces questions complexes ne peuvent pas s'étudier exclusivement *in vitro* et nécessitent l'utilisation de modèles animaux.

Le projet représente un ensemble d'études types qui pourront viser à comprendre des mécanismes impliqués dans la progression tumorale ou à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements. Le projet pourra comporter jusqu'à 16 études. Une étude comportera jusqu'à 60 souris ce qui portera le nombre d'animaux à 960 souris maximum sur 3 ans. Les dommages attendus sont liés au développement d'une tumeur de cancer de la prostate et éventuellement à l'apparition de foyers tumoraux secondaires (métastases). Un suivi rigoureux des animaux, une excellente connaissance des modèles et la définition de points limites adaptés permettront de prendre en charge les éventuels stress et douleurs occasionnés. Les animaux seront sous anesthésie générale durant les actes d'induction des tumeurs, durant la chirurgie permettant la castration de l'animal, pendant les examens d'imagerie ainsi que lorsque l'étude le demandera.

Ce projet qui mettra en oeuvre des approches par imagerie *in vivo* sera réalisé en respectant la règle des 3R :

**Raffinement** : les animaux seront étudiés par imagerie *in vivo* non invasive, ce qui n'induit pas de douleur et permet de réduire le stress infligé au cours de l'expérimentation. L'induction des modèles tumoraux et la procédure de castration seront réalisées sous anesthésie générale. La douleur sera également prise en charge par l'utilisation d'antalgique (paracétamol) et d'anti inflammatoire non stéroïdien (tolfédine). Enfin, au cours du développement tumoral, une stratégie de surveillance quotidienne à l'aide des grilles de scoring et de points limites pertinents nous permettra de réagir rapidement pour anticiper toute souffrance chez l'animal.

**Réduction** : la mise en oeuvre de l'imagerie permet de réaliser un suivi longitudinal des animaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux nécessaires à l'obtention de données.

**Remplacement** : les informations attendues ne peuvent pas être obtenues *in vitro* car à ce jour l'animal de laboratoire reste le seul recours permettant d'étudier le développement tumoral et l'efficacité thérapeutique en tenant compte de la complexité de la physiologie d'un organisme vivant.

**20376** Ce projet vise à montrer aux étudiants universitaires de niveau Master 2 en immunologie la plasticité du système immunitaire. Cette plasticité va se traduire en une réorganisation des structures lymphoïdes au cours d'un processus inflammatoire mais aussi en la modification des réponses des cellules immunitaires suite à cette inflammation. Ce processus a lieu de façon naturelle pendant une infection ou une vaccination. La notion de plasticité immunitaire est une notion complexe et relativement nouvelle en immunologie qu'il est important d'aborder avec des étudiants en immunologie au niveau de Master 2.

Nous prendrons comme modèle la souris dont une inflammation pulmonaire sera induite par l'administration intra-nasale de la bléomycine, un agent anti-cancéreux, utilisée en chimiothérapie et qui a pour effet secondaire la fibrose pulmonaire. L'administration par voie pulmonaire de bléomycine chez la souris C57BL/6, entraîne une inflammation précoce qui en disparaissant, laisse la place à une fibrose pulmonaire caractérisé par la formation de structures lymphoïdes de novo. Dans ce protocole, la bléomycine sera administrée par voie pulmonaire (intra-nasale) sous anesthésie pour permettre la distribution homogène de la bléomycine dans les poumons des souris traitées. Après traitement, une observation des souris quasi-journalière et un suivi clinique deux fois par semaine seront mise en place. Les souris seront mises à mort 15 jours après instillation, temps nécessaire pour observer les changements au niveau du système immunitaire des poumons. Nous analyserons alors l'activité du système immunitaire dans les poumons de souris traitées avec bléomycine par rapport aux souris contrôles. Nous espérons ainsi aborder des notions en

immunologie très actuelles par des techniques innovantes pour préparer les étudiants de M2 qui partent en stage le trimestre suivant à l'élaboration de projet porteur et novateur.

Dans ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement (règle de 3R) pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal.

Pour la dimension remplacement, la mise en place d'une réponse immune est un processus complexe qui ne peut pas être récapitulé *in vitro*. Nous utilisons donc un modèle de souris C57BL/6 qui est un animal très utilisé en laboratoire, peu coûteux, et qui permet l'utilisation de nombreux outils disponibles pour l'exploration immunologique du modèle. Le modèle C57BL/6 bléomycine est déjà largement décrit. C'est un des seuls modèles non-infectieux capable d'induire la formation de tissus lymphoïdes tertiaires chez la souris.

En ce qui concerne la réduction, le nombre de 12 souris par année universitaire (60 souris pour les 5 années du projet) est un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour l'étude de la mise en place de la réponse immunitaire et pour que chaque étudiant manipule entièrement 1 fois une souris (12 étudiants par année).

Pour la dimension raffinement, les souris seront hébergées dans des cages propres (2-5 souris par cage) sur portoir ventilé dans une salle réservée à l'hébergement de souris. Une observation quasi journalière sera assurée par le personnel animalier. Comme mesure d'enrichissement de l'environnement de la cage, nous mettons du coton et des nids végétaux, afin de réduire l'ennui et diminuer le stress en stimulant l'activité et en procurant un sentiment de sécurité à l'animal. Une période d'acclimatation (d'au moins 7 jours) sera respectée avant le début du protocole. L'administration de bléomycine par voie respiratoire sera effectuée sous anesthésie générale (mélange d'anesthésique et d'anti-douleur) pour favoriser une distribution de bléomycine homogène et reproductible dans les poumons.

Il n'y aura aucun prélèvement pendant la réalisation du protocole expérimental et à la fin du protocole les souris seront ensuite mises à mort par dislocation cervicale avant toute manipulation ultérieure réalisée par les étudiants.

Le raffinement sera aussi assuré par une surveillance quotidienne des animaux par le personnel de l'animalerie ainsi qu'un suivi clinique (observation et pesée) qui sera assuré par l'expérimentateur deux fois par semaine après administration de bléomycine.

Ce protocole inclut des points limites qui seront évalués pendant le suivi clinique à l'aide d'une grille de scores. Si le score limite est atteint, les animaux seront mis à mort. A la fin de chaque procédure, les souris seront mises à mort pour l'analyse de l'activité des cellules immunitaires.

**20377** L'évaluation de la sécurité pour l'homme de toute une série de produits qui vont du médicament au produit chimique est un processus complexe. Des méthodes informatiques et des expérimentations faisant appel à des cultures de cellules sont nécessaires, notamment en première approche. Mais des animaux de laboratoire essentiellement des rongeurs sont aussi utilisés dans des essais (toxicologiques, pharmacologiques, de tolérance) pour vérifier l'innocuité ou l'absence de risques à l'égard (selon le cas) de l'homme, des animaux, et/ou de l'environnement. Cette étape capable d'apporter une information, certes incomplète, mais fiable, est décrite dans des textes législatifs nationaux, européens ou internationaux qui précisent la nature des tests à réaliser avec les animaux utilisés à des fins scientifiques. La réglementation prend en considération également les conditions d'utilisation de l'animal de laboratoire pour assurer son bien-être (directive 2010/63/UE, convention STE 123 et le décret français 2013-118).

La compétence et le maintien des compétences du personnel en charge des animaux et la maîtrise des techniques appliquées sur l'animal de laboratoire font partie des paramètres fondamentaux à maîtriser pour la protection de l'animal utilisé à des fins scientifiques. Cela nécessite, en plus d'une formation initiale spécifique des techniciens, le maintien du savoir faire relatif aux techniques appliquées sur l'animal. Le but de ce projet est de décrire l'utilisation des animaux dans le cadre de la formation et du maintien des compétences du personnel.

La liste des techniques que le technicien chercheur doit maîtriser dans le laboratoire est définie par le responsable de la formation. Pour chaque technique un référent a été nommé (sur la base de son expérience et de ses compétences spécifiques relatives à au geste technique concerné).

Chaque référent met en place une formation pour tout nouveau technicien.

Pour le maintien de la compétence, le référent définit le rythme minimal de manipulation pour garder la dextérité nécessaire au bon geste technique.

Chaque technicien est également responsable de son niveau d'expertise à un temps donné et doit demander à maintenir son niveau de formation s'il en ressent le besoin.

Afin de respecter le principe de réduction du nombre d'animaux utilisés, les formations seront réalisées sur des animaux déjà présents dans l'animalerie (soit des animaux en études, soit des animaux exclus lors de la randomisation des études de toxicologie). La commande d'animaux spécifiques à ce projet sera exceptionnelle et réduite au strict minimum. Par année, pour un nombre moyen de 30 chercheurs et techniciens, le nombre maximum est estimé à 500 rats et 200 souris.

Ce projet ne concerne que des techniques faiblement invasives. Les animaux seront soumis aux mêmes attentions pour le maintien de leur bien-être que l'ensemble des animaux de l'établissement. Notamment, le suivi quotidien des animaux (y compris le week-end) et l'application des points limites seront identiques à ceux appliqués aux animaux en études.

**20378** En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires.

En France, le cancer est la cause d'environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes.

L'utilisation de l'immunothérapie représente une avancée scientifique majeure dans la lutte contre le cancer. Le but des traitements d'immunothérapie est d'utiliser le propre système immunitaire du patient pour se défendre contre le cancer en favorisant l'infiltration dans la tumeur de cellules immunitaires pouvant lutter contre les cellules tumorales, et en les aidant à contourner les mécanismes de protection des tumeurs pour mieux les détruire. Bien que de nombreuses stratégies thérapeutiques soient maintenant des succès en clinique, certains cancers présentent malgré tout des résistances aux traitements existants et imposent de poursuivre la recherche et le développement de nouvelles thérapies utilisant en particulier le système immunitaire afin de contourner ces résistances.

L'objectif de notre projet est de tester l'efficacité anti-tumorale de cellules du système immunitaire de souris, après avoir été modifiées *in vitro* et combinées éventuellement avec d'autres molécules anti-cancéreuses, sur des tumeurs solides de souris. On réalise alors une greffe autologue c'est-à-dire des cellules d'une souche d'animaux sur la même souche d'animaux. On parle aussi de transfert adoptif de cellules T.

Au préalable de la mise en œuvre de ce projet une première phase de sélection *in vitro* permettra d'identifier les cellules immunes modifiées les plus compatibles et efficaces avec le modèle de tumeur à étudier.

L'efficacité anti-tumorale évaluée dans ce modèle permettra d'estimer les interactions du traitement avec le système immunitaire et la tumeur et de contribuer à la sélection de futures thérapies transposables à l'homme.

Les objectifs de ce projet sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire et raffiner) :

Remplacement – La recherche de nouveaux médicaments contre le cancer impliquant le système immunitaire 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 et il est donc nécessaire que les molécules les plus abouties et les plus avancées dans leur développement soient administrées *in vivo*. Le fonctionnement du système immunitaire étant complexe et impliquant un grand nombre de

types cellulaires et de médiateurs, il n'est pas possible de le modéliser complètement *in vitro*. Le recours à l'animal est indispensable pour connaître l'activité pharmacologique dans un organisme entier et vivant, impliquant l'ensemble des mécanismes physiopathologiques.

Réduction – Ce projet est mis en œuvre après la validation *in vitro* des différentes nouvelles entités cellulaires, biologiques et chimiques. L'absence d'efficacité *in vitro* ne permet pas de justifier l'utilisation d'un modèle animal par conséquent cette étude s'inscrit en dernier lieu dans le processus de recherche d'un candidat médicament.

Un accompagnement par le service Biostatistique sera réalisé afin d'affiner les designs expérimentaux, d'estimer la variabilité des paramètres et in fine le nombre d'animaux nécessaire par groupe.

Raffinement – Dans un souci de bien-être animal, nos animaux sont stabulés en groupes sociaux tout au long de l'expérimentation. Ils bénéficient de plus, d'un enrichissement dédié, leur permettant d'exercer leur comportements naturels (ex. nidification, fouissement). Ils font l'objet d'une surveillance spécifique et accrue dans les phases les plus critiques de l'établissement des modèles afin d'anticiper au plus tôt une altération de leur état général et de mettre en place les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance.

Les prélèvements de sang seront réalisés par ponction à la veine saphène durant l'étude en respectant les recommandations de volume et de temps de récupération émis par notre SBEA, et sous anesthésie profonde lors de l'euthanasie en fin d'étude.

Ce projet est considéré comme de gravité prospective modérée pour les animaux.

Ces études prévoient l'utilisation de 3200 animaux maximum pour l'ensemble du projet soit sur une période de 5 ans.

**20379** Dans le monde, le nombre de patients atteints d'une maladie neurodégénérative (comme la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson), ou psychiatrique (comme la schizophrénie et la dépression), est estimé proche du milliard. D'autres maladies affectant le système nerveux ont un pronostic encore plus dramatique, à savoir les maladies cancéreuses, comme le glioblastome. L'allongement de la durée de vie est un facteur majeur d'augmentation du nombre de personnes atteintes de maladies affectant le cerveau. Le retentissement social pour les patients et leurs familles est considérable en raison des handicaps moteurs, intellectuels et psychiques qui en résultent.

Pour pouvoir proposer de nouveaux traitements pour ces maladies, il faut tout d'abord s'assurer que ces traitements sont capables d'atteindre le cerveau pour pouvoir être efficaces. Le cerveau est naturellement protégé par une barrière, appelée la Barrière Hémato Encéphalique (BHE) qui, du fait de sa fonction protectrice, est peu perméable aux molécules d'origine exogène.

L'objectif de ce projet est l'évaluation de la capacité de nos candidats médicaments dont la cible est située dans le système nerveux central à passer la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) après administration par voie périphérique chez le rat ou la souris.

Des rongeurs (rats et souris) vont ainsi permettre de mesurer la concentration du produit dans leur sang et leur cerveau à différents temps après administration de nos molécules par voie périphérique, le plus souvent par voie orale. L'évaluation de la présence des composés sera ensuite effectuée dans les échantillons de structures cérébrales et fluides biologiques (sang) prélevés après euthanasie des animaux.

Ce projet est en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner).

Remplacement :

Il existe des modèles de simulation de passage de barrière *in silico* ou *in vitro* (sur cultures de cellules) qui donnent une indication sur la capacité de passage de la barrière hémato-encéphalique des composés mais, n'étant pas prédictifs à 100%, ils ne permettent pas aujourd'hui de s'affranchir de l'administration des molécules dans le contexte d'un organisme animal vivant et complexe. Ces



modèles permettent à minima de sélectionner des composés qui auront données de bons résultats *in vitro* et seront donc privilégiés pour être testés ensuite chez l'animal.

Réduction :

Les composés qui n'auront pas un passage BHE suffisant ne seront pas testés ensuite dans nos modèles de recherche d'efficacité pharmacologiques relevant des pathologies étudiées, il contribue ainsi directement à la réduction du nombre d'animaux en permettant cette sélection en amont. L'évaluation du passage de nos composés sera privilégiée dans un premier temps chez la souris, la grande majorité de nos modèles pharmacologiques étant réalisés chez cette espèce. Le rat ne sera utilisé que de manière plus ponctuelle, dans le cas où le modèle de recherche d'efficacité pharmacologique doit être mis en oeuvre chez le rat, ce qui représente une très faible proportion de nos modèles pharmacologiques actuels. Le nombre d'études de passage de la BHE sur cette espèce sera donc beaucoup plus faible que sur la souris. Les tests d'efficacité chez le rat arrivent plus tardivement dans le processus de sélection de nos candidats médicaments, voire uniquement dans la phase de développement préclinique.

Dans notre processus de sélection des meilleurs candidats médicaments, ce projet se positionne à la suite des tests d'efficacité *in vitro* et d'évaluation de leur profil de pénétrance *in vitro*. Ces tests permettent d'écartier des produits qui n'auront aucune chance d'être efficaces dans les tests pharmacologiques *in vivo* et de ne sélectionner que les candidats potentiels. Une approche descriptive des niveaux de concentrations plasmatiques et cérébrales sera utilisée pour évaluer le passage de la BHE. Ainsi le nombre de 3 animaux, est suffisant par condition expérimentale pour permettre de conclure.

Dans ce projet il est prévu d'utiliser au maximum 3450 rongeurs avec environ 3000 souris et 450 rats sur une durée de 5 ans.

Raffinement :

Tous les animaux de ce projet font l'objet d'un suivi quotidien réalisé par les expérimentateurs et le personnel assurant leur soin en particulier après injection du produit à évaluer, afin de détecter tout signe de souffrance ou l'atteinte de points limites qui nécessiteraient le retrait de l'animal de l'étude. Chaque espèce disposera d'un enrichissement adapté dans les cages d'hébergement, comprenant du matériel de nidification (cocoons/sizzle pad) et des matériaux en bois à ronger (hexacubes et bâtonnets), de tubes pour les souris et huttes pour les rats.

Dans le cadre de ce projet, il est envisagé d'utiliser des souris génétiquement altérées (transgéniques ou mutantes) pour évaluer le passage de la BHE d'un produit donné lorsque les tests d'efficacité *in vivo* ultérieurs doivent être réalisés sur des souris génétiquement altérées. Le passage de la BHE d'un composé est évalué en première intention chez la souris non altérée génétiquement/ou sur le rat "sauvage" / "wild type", mais peut également être réalisé sur des lignées de souris génétiquement altérées si ces modèles doivent être utilisés dans le cadre des études d'efficacité pharmacologiques *in vivo* ultérieures. Les éventuelles recommandations en termes de limite d'âge ou de conditions de maintien émises par la SBEA seront appliquées.

**20380** Les infections nosocomiales (IN) posent un véritable problème de santé publique, alourdissant la prise en charge des patients hospitalisés, et générant de lourdes dépenses pour les établissements hospitaliers. Les principaux facteurs de risque d'acquisition d'une IN sont l'usage de procédures invasives, l'utilisation inappropriée d'antibiotiques et le statut immunitaire du patient.

L'enquête nationale de prévalence qui a été réalisée en 2017 incluant plus de 400 établissements de santé a montré que la prévalence des patients infectés est d'environ 5%. La prévalence est d'autant plus élevée que les patients sont âgés, immunodéprimés ou sont exposés à des dispositifs invasifs : cathéter vasculaire, sonde urinaire ou assistance respiratoire.

Les infections urinaires sont les plus fréquentes, devant les infections du site opératoire, les pneumonies et les bactériémies. Ces quatre localisations d'IN représentent 2/3 des sites infectieux majeurs. Les agents infectieux les plus prévalents dans les établissements de santé sont : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Parmi les différentes origines d'infections, notre projet se focalisera sur l'étude de la Bactériémie Nosocomiale (BN). La bactériémie correspond à une infection généralisée qui se caractérise par une décharge massive de bactéries dans le sang à partir d'un premier foyer infectieux. Elle est définie comme nosocomiale si la bactérie est détectée dans le sang (hémoculture positive) soit moins de 48h après l'admission, soit après 48h chez des patients ayant été hospitalisés ou opérés dans les derniers 7 jours ou 1 mois, respectivement

Les germes qui en sont responsables ont très souvent une résistance élevée aux antibiotiques ce qui place souvent le clinicien devant une impasse thérapeutique. Il devient ainsi urgent de trouver de nouveaux agents antimicrobiens ou de nouvelles approches antimicrobiennes.

L'objectif de cette étude est d'évaluer dans un modèle murin l'efficacité de la phagothérapie vis à vis d'une bactériémie nosocomiale.

La phagothérapie se définit par l'utilisation des phages lytiques, ceux-ci sont des virus, prédateurs naturels des bactéries, afin de traiter certaines maladies infectieuses d'origine bactérienne. Les phages lytiques, détruisent la bactérie. Ils utilisent la machinerie bactérienne à leur profit pour se multiplier. Au terme du cycle lytique, la bactérie éclate et plusieurs dizaines de nouveaux phages – identiques à l'original - sont libérés dans le milieu et donc disponibles pour s'attaquer à d'autres bactéries de la même espèce.

Pour évaluer la phagothérapie vis-à-vis des Bactériémies nosocomiales, notre étude se déroulera en trois parties complémentaires :

- (1) Mettre au point et caractériser une bactériémie nosocomiale chez un modèle murin (souris femelles âgées de 8 à 12 semaines). Elle sera induite respectivement par : *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, ou *Pseudomonas aeruginosa*.
- (2) Déterminer le profil de biodistribution des phages entre les différents organes cibles de l'infection.
- (3) Evaluer l'efficacité de la phagothérapie pour traiter les bactériémies nosocomiales.

Ces modèles permettront d'intégrer un grand nombre de caractéristiques de la pathologie humaine. Cette étude contribuera ainsi à apporter une première approche dans la stratégie à déployer chez les patients en échec thérapeutique atteints par des souches multi-résistantes.

Cette étude comportera 1 procédure légère et 2 procédures modérées interconnectées et progressives.

L'absence d'un modèle *in vitro* fonctionnel permettant de reproduire la majorité des interactions bactéries/hôte/phages, nous oriente vers l'utilisation de modèles animaux. Les modèles murins permettent de mimer plusieurs des syndromes cliniques observés au cours de cette infection chez l'homme, y compris l'infection pulmonaire et/ou la septicémie. Ils sont ainsi prédictifs de la stratégie à déployer chez les patients.

Les souris sont examinées quotidiennement ce qui permettra d'établir un score clinique en fonction de l'observation de plusieurs paramètres dont le poids, le comportement, et la 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.

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 nous permettra l'utilisation de systèmes d'imagerie dédiés aux petits animaux pour suivre l'infection.

Nous utiliserons des souris ayant un déficit immunitaire ou non (en fonction de la virulence de la souche).

954 souris seront utilisées sur 5 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).

**20381** L'imagerie par résonance magnétique (IRM) est, de loin, la technique d'imagerie la plus utilisée et la plus fructueuse pour évaluer l'anatomie et l'activité du cerveau humain. La méthodologie « Blood Oxygen Level Dependent » (BOLD), par exemple, est le contraste le plus utilisé pour l'IRMf montrant des détails étonnamment fins pour le suivi et la localisation de l'activation cérébrale. Cependant, ce signal ne représente pas directement l'activation neuronale, mais l'augmentation du flux sanguin qui en résulte. L'évaluation de la relation entre l'IRMf BOLD et l'activité neuronale réelle, dit 'couplage neuro-vasculaire' (CNV), est cruciale pour interpréter correctement le signal BOLD, et éviter les artefacts potentiels. Plusieurs études ont cherché à caractériser cette relation. Nous savons que, dans l'ensemble, l'IRMf BOLD est un bon rapporteur de l'activité neuronale, mais il reste encore de nombreuses questions relatives notamment au délai entre l'activation neuronale et l'augmentation du flux sanguin ? Et dans quelle mesure pouvons-nous localiser les neurones actifs en examinant l'activité des vaisseaux sanguins ? Répondre à ces questions fournira des améliorations notables de l'interprétation des données d'IRMf obtenues dans le cadre d'essais cliniques. Cela permettra également de suivre et comprendre les changements du CNV liés à une pathologie cérébrale et suggérera de nouvelles approches pour améliorer le pouvoir diagnostique d'IRMf pour nombreuses maladies du cerveau. Point n'intéressant, étant donné que l'IRMf est déjà utilisée dans les Hôpitaux, nous nous attendons à une traduction directe et rapide de nos résultats dans les systèmes de santé. La condition expérimentale idéale pour évaluer le CNV est d'enregistrer simultanément l'IRMf BOLD et l'activité neuronale au moyen d'approches complémentaires, telles que l'électrophysiologie. Cette condition implique l'utilisation de modèles animaux, sur lesquels on peut enregistrer de manière invasive l'activation cérébrale. Ces mesures ne peuvent être faites sur l'homme, en raison de leur caractère invasif, mais nous profiterons de la physiologie cérébrale relativement proche des rongeurs et de l'homme. De plus, BOLD n'est pas la seule technique d'IRMf disponible. Des approches alternatives d'IRMf, telles que l'IRMf pondérée en diffusion (dw-IRMf), le transfert de saturation par échange chimique (CEST) et le marquage de spin artériel (ASL) - pour mesurer respectivement l'activité cellulaire, des molécules d'intérêt et le flux sanguin cérébral - sont de plus en plus courantes en clinique au quotidien, mais elles ont également besoin d'une calibration par rapport aux régions cérébrales et à la physiologie.

Notre projet de recherche vise à déchiffrer les signaux IRMf en collectant des données multimodales sur les mêmes animaux, éventuellement simultanément. Outre les enregistrements électriques du cerveau, nous utiliserons des rongeurs génétiquement modifiés dont l'activité neuronale peut être pilotée ou enregistrée avec la lumière. Dans ce cas, nous pourrions utiliser des méthodes optiques pour collecter ces informations et les utiliser comme référence pour les signaux d'IRMf. Enfin, nous utiliserons également une nouvelle technique d'échographie capable de mesurer le volume sanguin cérébral avec la résolution spatiale et temporelle la plus élevée et nous comparerons ces données à celles de l'IRMf, encore une fois, provenant des mêmes animaux.

Nous prévoyons de réaliser toutes ces expérimentations avec des stimulations sensorielles (stimuli olfactif et visuel) sur des animaux implantés chroniquement avec des dispositifs optiques ou électriques, sous sédation, afin de préserver au maximum la réactivité cérébrale « normale » aux stimuli. Nous avons déjà démontré que le CNV est robuste vis-à-vis de la force du stimulus, du type, des régions cérébrales et, en première approximation, de l'état cérébral (sédation/éveil).

Cependant, l'activation cérébrale plus élevée pendant l'état d'éveil, malgré la fiabilité du CNV, pourrait produire des signaux BOLD très différents de ceux obtenus sous sédation. Pour cette raison, nous prévoyons également une série d'expériences sur des animaux éveillés, entraînés à l'environnement du scanner IRM pour éviter le stress. Dans le respect du concept des '3R' (remplacer, réduire et affiner), le nombre total d'animaux utilisés pour ce projet a été calculé en utilisant une approche statistique a priori basée sur un effet de taille acceptable. Au total, nous utiliserons 320 souris et 80 rats, pour tous les objectifs décrits. La combinaison des chirurgies chroniques, de neuroimagerie non invasive et de la sédation est de préserver le bien-être des animaux et de pouvoir les utiliser plusieurs fois pour réduire le nombre total d'animaux nécessaires à une étude. Pour réaliser cette combinaison, beaucoup de ressources sont investies en termes d'optimisation des techniques chirurgicales et de formation des opérateurs, ainsi que les coûts élevés associés aux scanners IRM. Sans risque d'erreur, cette combinaison représente l'effort le

plus efficace pour respecter les 3R, avec une attention particulière à la réduction des animaux. Le nombre de souris étant plus élevé que celui du rat en raison de la grande disponibilité des souris génétiquement modifiées (OGM) par rapport aux rats. L'imagerie IRMf étant basée sur des paramètres recueillis « *in vivo* » tels que le flux sanguin, nous ne pouvons pas remplacer l'utilisation d'animaux vivants, mais grâce à la nature non invasive des scanners d'IRMf, nous pourrions réutiliser le même animal plusieurs fois, sans compromettre sa qualité de vie. Cela signifie que le nombre total d'animaux requis, 400, est une surestimation du nombre réel d'animaux que nous utiliserons. Enfin, nous veillerons à éviter toute douleur et stress aux animaux : toute intervention chirurgicale se fera sous anesthésie profonde, accompagnée d'un traitement antalgique. Les rongeurs seront hébergés dans des cages ventilées avec de la nourriture et de l'eau ad libitum. Des tapis roulants et autres jouets seront également fournis dans chaque cage. Aucune restriction d'eau ou de nourriture ne sera appliquée, et le cycle lumineux physiologique de 12h ne sera pas perturbé. Les rongeurs du même sexe seront hébergés ensemble en cage et l'isolement ne se fera que dans des cas particuliers (animaux en difficulté ou blessés) et limité dans le temps à 2 mois maximum. Tous les scans IRMf seront effectués sous sédation et les expériences éveillées seront précédées d'une période d'habituation à l'environnement du scanner IRM.

**20382** L'atteinte des cellules ganglionnaires de la rétine, cellules nerveuses indispensables à la vision, est l'une des principales causes de cécité dans le monde occidental. Elle se traduit par une dégénérescence (mort progressive de ces cellules) qui peut conduire à une cécité complète. Elle est souvent observée au cours de divers états pathologiques tels que le glaucome, la rétinopathie diabétique ou des neuropathies optiques. Suite à ces pathologies, la communication entre la rétine et le cerveau est rompue et il n'existe à ce jour aucun traitement à ces atteintes des cellules ganglionnaires.

Les dispositifs de neuroprothèses implantables offrent la possibilité de restaurer cette communication et par conséquent les fonctions neurologiques (perception visuelle ou mouvements induits par les prothèses par exemple). Cependant, leur performance et leur durée de vie sont mal adaptées au tissu neuronal.

En recourant à de nouveaux matériaux synthétiques en diamant, biocompatibles et résistants à la corrosion, nous avons réussi à fabriquer des implants plus minces et plus résistants.

Des tests de vieillissement rapide ont permis de démontrer la viabilité de cette technologie fondée sur l'utilisation du diamant. Des évaluations *in-vitro* et *in-vivo* chez le rongeur ont démontré l'efficacité de ces implants pour l'enregistrement des tissus neuronaux.

Le but de cette étude est d'utiliser les implants pour capter les signaux électriques dans le cortex de primates non humains (PNH) suite à des stimulations visuelles. En effet, le modèle retenu pour valider l'efficacité de ces implants est celui des primates non-humains, qui est le seul à présenter des propriétés anatomiques similaires à l'humain au niveau des fonctions cérébrales et de l'anatomie de l'œil (notamment de la rétine), et qui est capable d'apprendre des tâches comportementales complexes. Le cortex des PNH réagit aux stimulations comme le ferait le cortex humain. Ceci est lié à la représentation unique de la zone rétinienne maculaire dans le cortex visuel, la zone maculaire n'étant présente que chez les primates. Cette zone rétinienne et la configuration correspondante du cortex ne sont pas présentes chez les rongeurs. Seuls des tests sur des PNH permettront donc d'évaluer la fonctionnalité des implants flexibles en diamant.

Trois primates seront nécessaires pour cette étude. Ce nombre correspond au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement exploitables. Les animaux, nés en captivité, proviendront d'élevages agréés à des fins scientifiques.

Les primates sont hébergés par groupe dans des cages conformes aux lignes directrices de l'annexe A révisée de la STE 123, ; les cages comportent des dispositifs de contact tactile et visuel, le groupe est maintenu en communauté visuelle, sonore et tactile.

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 *in vivo* chez le rongeur ont déjà été réalisés et ont permis d'améliorer la qualité de l'implant.

- Réduire : Des techniques non invasives utilisant des sondes classiquement appliquées en clinique humaine seront utilisées pour imager in-vivo le dispositif implantable et les tissus environnants. De cette façon, les changements tissulaires seront examinés sur les mêmes animaux à différents intervalles de temps. Un seul groupe d'animaux sera donc nécessaire. Chaque animal sera utilisé à la fois comme test et comme contrôle. En effet, un hémisphère du cortex sera testé avec un dispositif implantable utilisant les implants avancés tandis que l'autre moitié de l'hémisphère de l'animal servira de contrôle avec les matériaux de référence. Le nombre d'animaux requis est ainsi divisé par deux.

- Raffiner : Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions. Les actes chirurgicaux se feront sous anesthésie générale, et la douleur peropératoire sera gérée par l'administration d'analgésiques. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus qui engendreraient une souffrance de l'animal pour laquelle les traitements classiques (antalgiques, analgésiques) n'auraient pas d'effet. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a des signes de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

**20383** Les cellules du système sanguin qui circulent dans le sang se différencient toutes à partir de cellules souches dites hématopoïétiques. Par rapport à la durée de vie humaine, les cellules sanguines ont une durée de vie courte et doivent être constamment régénérées. La régénération des cellules sanguines nécessite une quantité énorme de protéines, nucléotides, lipides. Nous prévoyons donc que les modifications de notre alimentation peuvent influencer l'hématopoïèse.

Remplacement : Les études réalisées dans notre laboratoire montrent que les cellules qui fabriquent les cellules sanguines, c'est-à-dire les cellules souches et progénitrices utilisent différentes voies métaboliques pour produire de l'énergie. Lorsque nous modifions les voies métaboliques des cellules souches, nous pouvons influencer le type de cellule sanguine qu'elles produisent. C'est-à-dire que le métabolisme des cellules souches peut influencer la composition cellulaire du sang. Dans cette étude, nous avons l'intention de poursuivre ces travaux et de voir si nous pouvons moduler la composition du système immunitaire en modifiant le régime alimentaire des souris

Dans ce contexte, les modèles animaux comme la souris sont un outil indispensable pour étudier la complexité des voies de différenciation, ce qui ne peut être le cas avec des lignées cellulaires. A l'heure actuelle, il n'y a aucune méthode de remplacement possible.

Réduction : Sur 5 ans, 1344 souris seront utilisées et subiront des dommages faibles. Le nombre d'animaux a été ajusté au minimum nécessaire pour obtenir des résultats fiables.

Ce projet implique 2 procédures :

1) Intervention diététique

2) Suppression/stimulation du système hématopoïétique

Plus précisément, les souris reçoivent un régime alimentaire qui a été conçu pour influencer la composition du système immunitaire. Ainsi, nous modifierons la composition macromoléculaire de la nourriture des souris, par exemple en adoptant un régime riche en graisses ou en ajoutant des nutriments à l'eau potable. Nous prélevons ensuite des échantillons de sang sur nos souris et nous quantifions les principaux paramètres sanguins pour voir si les changements alimentaires influencent la composition cellulaire du système. À la fin de l'étude, les souris sont sacrifiées et nous mesurons l'abondance des différents sous-ensembles de cellules souches et de progéniteurs dans la moelle osseuse. Puis nous souhaitons comprendre si des changements alimentaires peuvent influencer la capacité du système hématopoïétique à retrouver son équilibre suite à une infection ou une chimiothérapie. Dans ces études, les souris seront placées dans un régime alimentaire défini

et ensuite leur système hématopoïétique sera perturbé par différents traitements. Nous quantifions ensuite l'abondance des différents sous-ensembles de cellules immunitaires dans ces contextes pour voir si les changements alimentaires favorisent la récupération de l'équilibre hématopoïétique.

Raffinement : En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de l'hématologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

**20384** Notre recherche est concentrée sur l'étude des cellules souches mammaires et intestinales à l'origine du cancer du sein et du colon. Nous étudions une voie de signalisation essentielle pour le développement et le maintien des tissus. Nous avons récemment développé des souris transgéniques qui nous permettent d'évaluer l'expression d'un marqueur spécifique de la voie de signalisation que nous étudions dans les cellules souches normales et tumorales *in vivo*.

L'organisation générale, le développement et le fonctionnement de la glande mammaire et de l'intestin sont très similaires chez la souris et chez l'homme. Le modèle souris est donc très utilisé dans la communauté scientifique afin d'étudier les mécanismes cellulaires et moléculaires du développement normal du tissu ainsi que de la tumorigénèse.

Notre stratégie repose essentiellement sur l'analyse des tissus prélevés post-mortem chez nos modèles murins transgéniques.

Remplacement : Nous concentrons nos efforts sur l'optimisation de méthodes *in vitro* pour analyser le comportement dynamique des cellules souches. Nous les utilisons en priorité par rapport à l'expérimentation *in vivo*. Toutefois, les organoïdes obtenus étant composés exclusivement des cellules épithéliales, les données obtenues *in vitro* devront être complétées par une analyse *in vivo* dans un environnement cellulaire physiologique. De plus, les animaux seront essentiels pour tracer les cellules souches cancéreuses au sein de la tumeur, étant donné qu'il n'existe actuellement aucun modèle *in vitro* qui puisse récapituler l'hétérogénéité cellulaire tumorale. L'ensemble de notre projet contribuera à une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant la fonction des cellules souches et leur rôle dans le développement tumoral, indispensable pour le développement de thérapie.

Réduction : Pour les 5 ans à venir, il est prévu d'étudier une dizaine de lignées transgéniques différentes, conduisant à l'analyse de 1005 souris au total. Le nombre de souris utilisées est ajusté au plus bas mais compatible avec l'obtention de résultats statistiquement fiables. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux et exploiter au mieux les prélèvements, des informations seront obtenues au niveau cellulaire et moléculaire à partir du même animal. Pour cela, lorsque c'est possible, différents tissus seront prélevés sur le même animal. La stratégie de croisement des souris transgéniques est optimisée afin d'obtenir les cohortes de souris appropriées.

Raffinement : Toutes les souris transgéniques sont viables et ne présentent aucun problème sévère de santé à l'âge adulte. Les modèles de tumorigénèse que nous étudions n'entraînent pas de souffrance notable. Les tumeurs restent localisées et sont prélevées conformément aux règles de l'éthique. Toutes les interventions prévues sur les souris vivantes sont peu invasives (injections intra-péritonéales non douloureuses).

Une grille de score sera mise en place pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance si nécessaire.

**20385** Parmi les cellules du système immunitaire, on trouve les lymphocytes T qui jouent un rôle majeur lors d'une infection ou dans la réponse anti-tumorale. Lors d'une infection ou d'un processus tumoral, les lymphocytes T vont alors proliférer et se différencier soit en cellules effectrices soit en cellules mémoires.

Les cellules effectrices migrent vers le site de l'infection ou la tumeur afin d'éliminer l'agent responsable. Les cellules mémoires assureront une protection contre de nouvelles infections par ce

même pathogène en permettant une deuxième réponse immunitaire plus rapide. Dans certaines circonstances, les cellules mémoires vont aussi pouvoir jouer un rôle contre le cancer.

Au cours de la réponse immunitaire, les cellules effectrices vont être éliminées tandis que les cellules mémoires vont pouvoir en majorité survivre dans les tissus jusqu'à des dizaines d'années. Les mécanismes de contrôle épigénétique régulent l'expression des gènes et sont très importants pendant la différenciation des cellules immunes, par exemple lors d'une réponse immunitaire contre une infection virale ou contre des tumeurs.

Le projet va porter sur l'étude de ces mécanismes de contrôle épigénétique lors de la mise en place de ces fonctions des lymphocytes T et leurs conséquences sur les réponses immunitaires.

Les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales seront analysées dans des souris génétiquement modifiées pour l'expression de certaines molécules (facteurs épigénétiques) impliquées dans ces voies de régulation. Les découvertes que nous ferons dans ce cadre seront directement applicables dans le domaine de la vaccination, aussi bien contre les infections que contre le cancer.

Pour étudier la différenciation des lymphocytes T en cellules mémoires, les animaux seront infectés avec une souche du virus de la grippe et nous évaluerons ensuite la réponse immunitaire par cytométrie de flux.

Afin d'évaluer la capacité des cellules mémoire à protéger les souris contre une seconde infection, nous infecterons des animaux avec 2 souches différentes du virus de la grippe. Ces infections seront faites avec au moins 30 jours d'intervalle.

Comme la différenciation de certaines cellules mémoires est dépendante de la spécificité du récepteur antigénique T (TCR), nous allons injecter à des souris receveuses des cellules T issues de souris transgénique pour notre gène d'intérêt et dans lesquelles toutes les cellules T expriment un TCR unique.

Pour évaluer la réponse immunitaire, ces mêmes souris seront infectées avec le virus de la grippe ou seront injectées avec des cellules tumorales.

Remplacement : Le système immunitaire est un système complexe composé de nombreux types différents des cellules, qui interagissent dans des organes spécialisés. Même si des expériences *in vitro* ont déjà été réalisées pour évaluer certaines fonctions des cellules T déficientes pour des facteurs épigénétiques, il est nécessaire d'évaluer ces mécanismes dans un système animal vivant intégré tel que la souris. Ces expériences permettront de confirmer les mécanismes intégrés de défense immunitaire identifiés lors d'expériences *in vitro*,

Réduction : Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera d'un maximum de 403 animaux. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, 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 et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score

**20386** La radiothérapie est une des options thérapeutiques les plus importantes dans le traitement des cancers. La protonthérapie est une modalité particulière de radiothérapie des cancers qui consiste à irradier la tumeur avec un faisceau de protons au lieu de photons qui sont les plus utilisés. L'avantage considérable de cette technique plus complexe et coûteuse tient au fait qu'on peut ainsi délivrer un maximum de dose à la profondeur de la tumeur avec une toxicité réduite entre la peau et la tumeur et nulle au-delà. 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 cette protonthérapie génère encore des séquelles notamment neurologiques décrites en particulier chez les enfants guéris de leur tumeur cérébrale.

Une nouvelle technique de radiothérapie émerge actuellement, et consiste en une administration des rayonnements à très haut débit de dose, plusieurs ordres de grandeur plus élevés que ceux utilisés actuellement dans la radiothérapie clinique conventionnelle et dont le potentiel thérapeutique est très prometteur. Cette technique induit un phénomène par lequel le rayonnement réduit les toxicités tissulaires communément associées à la radiothérapie conventionnelle, tout en maintenant le contrôle de la tumeur. Il a été notamment démontré que lorsqu'une dose de rayonnement (qui habituellement induit inexorablement une fibrose pulmonaire majeure chez la souris au bout de quelques mois), est délivrée à un débit de dose très élevé, le tissu pulmonaire est protégé de la fibrose.

Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cet avantage très prometteur en thérapeutique mais il persiste beaucoup d'inconnues.

Le but de notre projet est de vérifier l'hypothèse suivante : le fait de délivrer la dose de rayons en un temps très court, c'est-à-dire avec un très fort débit, réduirait fortement sa toxicité sur les acides gras présents dans la membrane des cellules normales (en particulier des neurones du cerveau) et indispensables à leur bon fonctionnement, sans diminuer les effets toxiques sur les cellules cancéreuses.

Pour vérifier cette hypothèse, nous allons irradier le cerveau ou les poumons de, au maximum, 280 souris sous anesthésie générale, puis étudier à différents temps après irradiation les produits d'oxydation des lipides dans les échantillons biologiques prélevés post-mortem. Nous allons également vérifier l'effet protecteur sur les poumons par de l'imagerie non invasive recherchant de la fibrose.

Concernant la nature du rayonnement utilisé, nous avons choisi la protonthérapie car cette modalité de rayonnement est utilisée en priorité pour les enfants et les adultes jeunes porteurs de tumeurs thoraciques et cérébrales. De nombreux enfants sont guéris mais avec des séquelles notamment neurocognitives altérant leur qualité de vie.

Remplacement :

Les effets protecteurs des tissus sains après irradiation en électrons à très haut débit ont été décrits uniquement *in vivo* sur le poumon et le cerveau de souris. Pour reproduire et analyser ces effets après irradiation en protons, il nous faut donc reproduire les mêmes conditions expérimentales *in vivo* cette fois avec des protons.

Réduction :

Le nombre d'animaux a été statistiquement défini pour permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible.

Raffinement :

Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé en continu, avec un enrichissement adapté à leur espèce. Une période minimale de 7 jours sera respectée entre l'arrivée des souris et l'application des procédures expérimentales pour leur permettre de s'acclimater à leur nouvel environnement et ainsi limiter leur stress.

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 en cas de besoin. 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.

**20387** Le tube digestif est un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules de l'hôte, une grande diversité de microorganismes et des antigènes alimentaires. Les bactéries y jouent un rôle crucial pour le développement de l'épithélium intestinal et le maintien d'un système immunitaire sain. Ainsi un déséquilibre de la composition du microbiote a été montré chez les patients atteints de cancers, de maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) ou de maladies métaboliques comme l'obésité ou le diabète. Notre travail de recherche vise à mieux comprendre les interactions entre



l'hôte et les bactéries intestinales dans des conditions physiologiques et physiopathologiques (individus malades). Ces pathologies et notamment le cancer colorectal (CCR), sont de plus en plus prévalentes dans les pays occidentaux et impactent fortement leur population, il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, afin de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Alors que le gène APC, qui est un gène suppresseur de tumeur, est muté dans 80% des cancers colorectaux chez l'homme nos travaux récents mettent en évidence l'activation par certaines bactéries du tube digestif associées au CCR d'une voie de l'immunité innée appelée ALPK1 (ces bactéries sont appelées pro-ALPK1).

Nous émettons l'hypothèse que l'activation de cette voie ALPK1 par des bactéries intestinales pourrait impacter le développement des CCR ou la réponse aux traitements anti-cancéreux. L'objectif de notre projet est d'explorer le rôle de la voie ALPK1 et des bactéries pro-ALPK1 dans le développement du cancer colorectal, d'en déchiffrer les mécanismes sous-jacents, évaluer de potentielles approches thérapeutiques et d'identifier la pertinence de ces stratégies chez des patients humains.

Afin d'appliquer au mieux la règle des 3R, pour identifier des bactéries pro-ALPK1, nous avons prévu dans nos projets scientifiques d'utiliser des expérimentations *in vitro* sur des lignées cellulaires préalablement à l'utilisation d'animaux, ce qui permet d'en réduire le nombre. Néanmoins, il n'existe pas aujourd'hui de modèle récapitulatif tous les paramètres du tube digestif et cette étude de relation entre les bactéries du microbiote et l'hôte ne peut pas être réalisée *in vitro* ni modélisée *in silico*. Il est donc nécessaire d'utiliser le modèle animal pour valider les hypothèses soulevées grâce aux résultats des expérimentations *in vitro*. Ces expérimentations animales permettront de mieux comprendre le rôle d'ALPK1 et des bactéries pro-ALPK1 dans les mécanismes intervenant dans le passage d'une inflammation chronique de l'intestin au développement d'un cancer colorectal. Pour cela, nous utiliserons deux modèles : 1) un modèle de souris développant spontanément des tumeurs intestinales, porteuses d'une mutation dans le gène APC (Adenomatous Polyposis Coli), appelées APC<sup>min/+</sup>, et qui sont un des modèles animaux de référence pour étudier le cancer colorectal et 2) un modèle de souris où le cancer colorectal est induit par un agent mutagène, l'AOM (azoxyméthane) et par une inflammation au long court induite par le dextran sodium sulfate (DSS) et qui se rapproche ainsi de ce que l'on peut observer chez les patients atteints de MICI, des inflammations répétées de l'intestin. Ces expérimentations seront réalisées sur plusieurs semaines en fonction de l'étape de carcinogénèse étudiée de 8 à 20 semaines.

Dans ces deux modèles, nous administrerons des bactéries ou des molécules qui modulent la signalisation de la voie ALPK1 (appelées bactéries ou molécules pro-ALPK1). Ces bactéries ou molécules peuvent influencer le nombre et la taille des tumeurs. Nous attendons de ce projet de recherche des avancées dans la compréhension du rôle du microbiote et de la voie ALPK1 dans l'installation et le développement du cancer colorectal. Cela pourrait permettre d'ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques dans le traitement des cancers.

Nous vérifierons alors l'impact de ces bactéries ou molécules sur l'évolution de la pathologie. Durant la totalité des protocoles, les animaux seront évalués quotidiennement par l'expérimentateur, notamment au niveau de la perte de poids et de la sévérité de la maladie (consistance et présence de sang dans les fèces, comportement et état général). L'essentiel des prélèvements (sang, tissus, contenus intestinaux) sera fait post-mortem à l'exception des fèces qui pourront être prises régulièrement et d'un prélèvement sanguin réalisé au moment de l'euthanasie. Nos groupes de souris seront réduits à 12 animaux par traitement testé.

Dix lignées de souris génétiquement modifiées nous seront nécessaires à l'élucidation du rôle d'ALPK1 dans le CCR. En effet, nous utiliserons des souris chez lesquelles le gène ALPK1 sera invalidé dans la totalité de l'organisme et des lignées dans lesquelles le gène sera invalidé uniquement dans certains types cellulaires : cellules intestinales ou cellules immunitaires. L'utilisation de ces différentes lignées de souris permettra d'identifier les types cellulaires liés à l'implication d'ALPK1 dans le CCR. Ainsi, nous utiliserons un total de 4936 souris. Chaque expérience sera réalisée avec des contrôles adéquats et 12 animaux par groupe pour garantir la

qualité statistique des données. Des souris non traitées seront également indispensables à la compréhension des différents résultats obtenus. Les souris seront hébergées dans des pièces thermo-régulées et contrôlées afin de garantir un cadre de vie optimal. Nous veillerons à enrichir le cadre de vie des souris, avec dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout d'un abri obscur en polycarbonate. Les souris seront 4 par cage pour éviter l'isolement. Les gavages et injections seront réalisés par du personnel expérimenté. Un score est réalisé en tenant compte de la perte de poids, l'apparence et le comportement. Dans le cas où l'animal présenterait un score trop élevé une euthanasie sera pratiquée par l'expérimentateur en charge du suivi quotidien. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

**20388** Le microbiote intestinal est une communauté dynamique de microorganismes (bactéries, champignons, virus et archéobactéries) influencée par de multiples facteurs tout au long de la vie d'un individu. La transmission du microbiote par la mère est le facteur le plus important qui conditionne le schéma de colonisation microbienne du nouveau-né (primocolonisation). L'accouchement par césarienne, en supprimant cette transmission du microbiote de la mère, induit des perturbations majeures au niveau de la primocolonisation de l'intestin du nouveau-né. Il a été suggéré qu'il existe une période critique au cours du développement précoce où les perturbations des interactions microbiote-hôte pourraient entraver l'établissement d'un équilibre interne sain, c'est-à-dire l'homéostasie. De telles perturbations peuvent prédisposer les enfants au développement de problèmes de santé généralement associés aux modes de vie occidentaux, tels que les maladies inflammatoires de l'intestin et l'obésité. Concrètement, la césarienne est souvent associée à l'augmentation du risque de maladies inflammatoires comme la maladie de Crohn (15% plus de risque) et aussi à l'obésité (20% plus de risque).

L'objectif du projet est d'identifier des bactéries potentiellement bénéfiques (probiotiques) pour les enfants nés par césarienne qui permettraient de réduire les risques des troubles associés à la césarienne. Dans ce projet, nous nous proposons de comparer, dans le modèle murin, l'implantation de microbiotes de bébés humains issus de leurs fèces suite à une naissance par césarienne ou par voie basse. Pour cela, nous coloniserons d'abord dès la naissance, et par tétagage des souris dépourvues de microbiote avec l'un ou l'autre des microbiotes pour analyser l'impact différentiel des deux types de primocolonisation. Nous analyserons notamment pour ces deux conditions le microbiote, la fonction barrière de l'épithélium intestinal et des paramètres du système immunitaire. Dans un deuxième temps, et seulement si nous observons des différences entre ces 2 groupes, nous caractériserons de manière approfondie les effets et mécanismes d'action de 2 probiotiques identifiés dans des expérimentations préliminaires et présumés bénéfiques. Nous comparerons des paramètres physiologiques (suivi du poids, du microbiote) et inflammatoires (dosages de cytokines) des souriceaux colonisés avec un type ou l'autre de microbiote et, dans le cas de souris colonisés avec le microbiote des enfants nés par césarienne, supplémentés ou non par les deux probiotiques d'intérêt au moment de la colonisation, afin d'analyser le bénéfice potentiel d'une supplémentation chez des animaux colonisés avec un microbiote type césarienne. Nous travaillerons sur des souris C3H élevées dans des enceintes stériles (isolateurs). L'élevage en isolateur permet d'obtenir des animaux dépourvus de microorganismes (axéniques) que nous coloniserons avec nos deux types de microbiotes (bébés nés par voie basse ou par césarienne).

Ces travaux nécessitent l'utilisation d'animaux vivants car les phénomènes étudiés (développement de l'intestin, inflammation intestinale) ne peuvent pas être reproduits par des méthodes de substitution *in vitro* comme la culture de cellules humaines.

Nous utiliserons au maximum 60 mères et 360 souriceaux au cours de ce projet. Pour toutes les procédures expérimentales, nous avons calculé le nombre minimal de souris requis afin d'aboutir à des données analysables par des méthodes statistiques.

Nous améliorerons le bien-être des animaux via un enrichissement apporté dans les cages (fourniture de cellulose permettant la construction de nids par les animaux, bâtons à ronger pour les mères). Nourriture et eau seront accessibles en permanence. Les manipulations ont une durée maximale de 3 semaines. Nos procédures sont faiblement invasives, néanmoins les animaux seront

observés quotidiennement et une attention particulière sera apportée pour réduire le temps de séparation mère-souriceaux lors de la prise de poids, la récupération de fèces et le tétage (les gestes seront réalisés par des manipulateurs spécialisés qui veilleront à les réaliser le plus rapidement possible pour réduire le temps de séparation). Le tétage sera réalisé 3 fois pour maximiser la colonisation des souris pour nos microbiotes d'intérêt. Par ailleurs, des critères d'arrêt ont été définis (perte de poids pour les mères, absence de gain de poids pour les petits, immobilité). Si deux de ces critères sont atteints l'animal sera mis à mort.

L'objectif du projet est de confirmer que des candidats probiotiques pourraient bien être utiles pour compenser les altérations causées par les naissances par césarienne en réalisant des essais reproduisant ces deux types de colonisation, à partir de souris dépourvues de microorganismes. Les animaux seront soumis à un stress lié à la séparation précoce de leurs mères mais ne subiront pas de protocoles invasifs.

**20389** Le cancer de l'œil le plus fréquemment rencontré chez l'humain 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). La radiothérapie 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. La catégorie de médicament que nous souhaitons tester, un inhibiteur de la voie des Rho-kinases, est déjà connue 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 travailler sur des organismes vivants pour mieux comprendre les mécanismes mis en jeu, dans leur environnement habituel.

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). La durée de suivi de chaque animal sera de maximum 6 mois.

Tout au long de la construction de ce projet, nous nous sommes efforcés à suivre les recommandations de la règle des 3R, afin d'améliorer le bien-être animal :

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 330 animaux. Le nombre d'animaux a été réduit en combinant le maximum d'analyses biologiques sur les mêmes échantillons de rétine. Les rétines prélevées seront séparées en deux demi-rétines afin de doubler le nombre d'analyses réalisables à partir d'un œil pour avoir des données significatives. De plus, des travaux antérieurs ont permis de déterminer des informations importantes, comme la dose d'irradiation à utiliser ou les analyses moléculaires à réaliser. Nous pouvons utiliser directement ces données, sans devoir les déterminer à nouveau, afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux requis.

Raffiner : Tous les examens et interventions sur les animaux se feront sous anesthésie générale, avec parfois anesthésie topique complémentaire, limitant ainsi tout stress ou douleur causés aux animaux. Les interventions qui seront réalisées dans le cadre de ce projet sont également pratiquées chez l'homme soit sous anesthésie topique (injection intraoculaire) soit sans anesthésie (radiothérapie, imagerie oculaire) et sans douleur majeure. Les animaux seront surveillés quotidiennement. Une grille de score sera mise en place pour évaluer de façon objective l'état de l'animal et prendre les mesures adéquates pour arrêter immédiatement sa souffrance si nécessaire. 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.

**20390** L'intestin grêle joue un rôle essentiel dans l'absorption des nutriments qui proviennent de notre alimentation. Aussi, du fait de son contact direct avec l'environnement, il est susceptible d'être soumis à des attaques bactériennes et biochimiques qui peuvent compromettre l'étanchéité de la barrière intestinale. Cette barrière est formée par une unique couche de cellules – cellules épithéliales – qui tapissent des protubérances qui se projettent dans la lumière de l'intestin, appelées les villosités intestinales, et des petites invaginations qui contiennent des cellules souches, appelées les cryptes. Grâce à la division des cellules souches dans les cryptes, l'épithélium des villosités intestinales se renouvelle de manière permanente, formant un nouvel épithélium toutes les semaines. Ainsi, les cryptes assurent le maintien d'une barrière épithéliale fonctionnelle.

A la naissance, les villosités sont déjà formées mais pas les cryptes. Bien que les cellules souches existent, les invaginations caractéristiques des cryptes ne sont pas présentes, celles-ci n'apparaissent que 10 jours après la naissance. Au cours de ces 10 jours, les cellules épithéliales ont un mouvement d'invagination, qui repose sur une contraction des cellules. La Myosin IIA est une protéine majeure dans la contraction cellulaire mais son rôle est méconnu lors de la formation des cryptes. Notre projet a pour objectif d'étudier le rôle de la Myosin IIA lors de la formation des cryptes de l'intestin grêle.

Remplacement :

Les animaux utilisés seront des souriceaux car la structure et le développement de l'intestin grêle sont similaires à ceux de l'Homme. Ce développement, avec l'apparition des cryptes absentes à la naissance, est étudiable seulement grâce à des études *in vivo*, impossible à remplacer par des

approches *in vitro* que nous utilisons par contre pour des analyses chez l'adulte. La lignée permettant une ablation spécifique du gène de la Myosin IIA dans les cellules de l'épithélium intestinal est déjà connue de notre laboratoire.

Réduction :

Deux jours après la naissance, la totalité des souriceaux de 3 portées (au total 18 à 30 maximum) seront traités afin d'induire une ablation spécifique du gène de la Myosin IIA. L'utilisation de toute la portée permet d'avoir à la fois des animaux contrôles et des animaux d'intérêts. Nous quantifierons le nombre de cryptes correctement formées chez les souriceaux contrôles et comparerons au nombre de cryptes formées chez les souriceaux chez qui le gène de la Myosin IIA a été aboli.

Raffinement :

Ce traitement est une procédure indolore et non invasive, de plus, les conditions d'hébergement des animaux sont optimisées pour limiter leur stress. Néanmoins, une observation journalière des animaux est réalisée afin de noter tout signe clinique anormal, et en cas de signes de détresse des points limites seront mis en œuvre.

**20391** Le but de ce projet est d'assurer, conformément aux exigences de la réglementation sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques, la formation du personnel aux techniques utilisées dans les procédures (administration, prélèvement, chirurgies) et de permettre le maintien des compétences. Le 2ème objectif est le développement et la mise au point de nouvelles techniques d'administrations, de prélèvements ou chirurgies ou le développement de nouveaux modèles qui seront ensuite utilisés dans des études précliniques ou pour la collecte de fluides/tissus biologiques. Des améliorations de techniques existantes peuvent aussi être faites dans un objectif de raffinement (technique moins invasive, plus rapide, validation de nouveaux protocoles d'analgésie ou d'anesthésie) qui seront bénéfiques pour le bien-être animal.

Le projet se déroule sur 5 ans et utilisera 2650 souris, 3750 rats et 60 cobayes. Le nombre pour chaque espèce est ajusté au minimum nécessaire en fonction du nombre de personnel à former, du nombre de techniques nécessitant une formation et du nombre de techniques à développer.

Les premières étapes de la formation du personnel se font en utilisant des supports vidéo ou des mannequins artificiels afin de réduire le nombre d'animaux utilisés à ces fins. Une fois la gestuelle maîtrisée, il est nécessaire de poursuivre la formation en conditions réelles, c'est-à-dire en intégrant la prise en compte des réactions et comportement des animaux.

Le développement/raffinement de méthodes ne peut être réalisé en utilisant des méthodes alternatives (ex : *ex vivo* ou *in vitro*) car les conditions expérimentales des futures études précliniques réalisées *in vivo* ou des futures conditions de prélèvements de matrices doivent être validées. Cependant, dans la mesure du possible, une première phase de validation des paramètres techniques sera réalisée sans utilisation d'animaux, des animaux déjà utilisés dans des projets antérieurs seront utilisés sur ce projet afin de réduire le nombre total d'animaux. Dans la mesure du possible, les animaux utilisés sont issus d'un projet précédent et non commandés seulement pour la formation ou le développement de techniques.

Afin d'améliorer leur bien-être, les animaux seront hébergés en groupes sociaux (sauf incompatibilité sociale), sur litières (rongeur) et disposeront d'un programme d'enrichissement adapté aux besoins de l'espèce (matériel de nidification et à ronger pour souris et rat, foin/paille compressé et jouet pour les cobayes). A l'issue du projet, les animaux pourront être réutilisés dans un autre projet ou remplacés.