



**MINISTÈRE DE L'ÉDUCATION NATIONALE,  
DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE**

**Secrétariat d'Etat  
à l'enseignement supérieur et à la recherche**

Résumés non techniques des projets autorisés (30)

3001. L'objectif de ce projet est de suivre en imagerie des tumeurs murines de cancer du rein sous chimiothérapie. En effet, les tumeurs cancéreuses souffrent d'un manque d'oxygène car leurs vaisseaux sont souvent inadéquats par rapport à leurs besoins. Cette condition, appelée hypoxie, est associée à une agressivité plus marquée, à une augmentation du risque de dissémination (métastase) et à une moins bonne réponse aux traitements. Il est donc important de pouvoir détecter et quantifier le degré d'hypoxie des tumeurs.

L'imagerie permet de mesurer l'hypoxie par des techniques innovantes, telles que l'imagerie par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), détectant les électrons ; l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), déjà utilisée chez l'Homme, qui permet elle aussi de quantifier l'oxygénation des tumeurs par des techniques indirectes (IRM BOLD estimant l'oxygénation à partir d'un produit de dégradation de l'hémoglobine, transporteur de l'oxygène dans le sang) et la qualité de leur vascularisation (IRM de perfusion ou DCE).

Nous injecterons des cellules tumorales du cancer rénal à 30 souris.

Nous réaliserons deux groupes de souris, l'un recevant le traitement, l'autre un placebo, puis étudierons par ces différentes techniques d'imagerie (RPE, IRM BOLD et DCE) l'oxygénation et la perfusion tumorale.

Après l'euthanasie des souris, les résultats obtenus seront comparés aux données histologiques, afin de valider ce qui est visualisé en imagerie

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum.

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

3002. Le psoriasis est une maladie inflammatoire de la peau qui touche 2-3% de la population et qui se manifeste par la formation de plaques érythémateuses et de squames. La physiopathologie du psoriasis fait intervenir des mécanismes inflammatoires dont l'origine est mal comprise et la prise en charge des formes sévères de cette maladie reste difficile. Il est donc important d'améliorer notre compréhension de la pathophysiologie du psoriasis afin d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques.

L'imiquimod (IMQ) est un agoniste des récepteurs TLR7 et TLR8 qui agit comme un stimulateur de la réponse immune innée. L'application de ce composé sur la peau de personnes prédisposées peut induire ou exacerber la formation de plaques psoriasiques. Chez la souris, l'application d'IMQ sur la peau conduit au développement d'une inflammation cutanée avec un influx de cellules inflammatoires et une hyperplasie de l'épiderme qui ressemble aux lésions psoriasiques humaines, tant par ses caractéristiques phénotypiques et histologiques que par certains de ses mécanismes effecteurs.

Les cytokines de la famille de l'interleukine (IL)-1 sont impliquées dans la pathogenèse de nombreuses maladies inflammatoires. Cette famille inclut 7 agonistes (IL-1a, IL-1b, IL-18, IL-33, IL-36a, IL-36b, IL-36g) et 4 membres avec une activité antagoniste établie ou supposée (IL-1Ra, IL36Ra, IL-37, IL-38). Parmi ces derniers, l'IL-37 a été décrite chez l'homme, mais ne possède pas d'homologue chez la souris.

L'IL-36 joue un rôle important dans le développement de l'inflammation cutanée induite par l'IMQ chez la souris, qui est exacerbée en absence de son antagoniste IL-36Ra. Chez l'homme, un déficit en IL-36Ra est à l'origine d'une forme sévère de psoriasis pustuleux. Par ailleurs, un déficit en IL-1Ra, l'antagoniste de l'IL-1a/b, est également à l'origine d'une inflammation cutanée chez l'homme et la souris et, l'IL-1 et l'IL-36 semblent contribuer par des mécanismes complémentaires à la pathogenèse de l'inflammation cutanée induite par l'IMQ. Peu de données sont disponibles concernant les fonctions biologiques de l'IL-38. Son rôle anti-inflammatoire, ainsi que l'identité de son/ses récepteur(s) restent controversés. Il a été montré que l'IL-38 pouvait lier le récepteur à l'IL 1, suggérant qu'elle pourrait bloquer l'activité de l'IL-1a/b. A l'inverse, selon une autre étude, l'IL-38 lierait le récepteur à l'IL-36 et exercerait des effets similaires à ceux de l'IL-36Ra.

Nos résultats préliminaires montrent une forte expression d'ARNm codant pour IL-38 dans la peau chez la souris et chez l'homme. Le but des expériences décrites dans cette demande est d'évaluer le rôle de l'IL-38, et notamment un effet

potentiellement anti-inflammatoire de cette cytokine, dans le modèle de psoriasis induit par l'application d'IMQ. Pour cela, nous souhaitons tester l'effet de la surexpression de l'IL-38 dans ce modèle murin de psoriasis, par l'utilisation d'un virus AAV, et le comparer avec l'effet d'un AAV surexprimant l'IL-36Ra, afin de définir les rôles respectifs de ces 2 antagonistes. Les virus AAV-mIL-38, AAV-mIL-36Ra ou AAV-GFP (contrôle) seront injectés à titre préventif, avant l'induction du psoriasis.

Dans cette étude, notre hypothèse de travail est que l'IL-38, qui est exprimée dans la peau chez l'homme et la souris, pourrait agir comme un inhibiteur naturel au cours de la réponse inflammatoire, et présenterait donc potentiellement un intérêt thérapeutique pour des maladies inflammatoires telles que le psoriasis. L'étude décrite dans cette demande nous permettra d'étudier la fonction de l'IL-38, ainsi que son importance relative par rapport à l'IL-36Ra, au cours de l'inflammation cutanée et de sa résolution dans un modèle de psoriasis induit par l'application d'IMQ. Nous espérons qu'une meilleure compréhension des rôles respectifs de l'IL-36Ra et de l'IL-38 permettra le développement de nouvelles approches thérapeutiques pour le psoriasis ou d'autres maladies inflammatoires cutanées.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement de ce projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus *in vitro*, et une éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations *in vitro*.

Le nombre d'animaux utilisés pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative, à savoir 8 animaux par condition, à raison de 3 conditions pour chaque expérimentation (groupe contrôle avec injection d'AAV GFP, groupe AAV IL-36Ra, groupe AAV-IL-38) pour le modèle IMQ étudié, analysés à 3 temps distincts (pic, résolution précoce et résolution tardive) (soit 72 animaux). Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés si besoin.

Une utilisation de 144 souris si l'expérimentation principale est répétée une fois (ou 216 si besoin de répéter deux fois l'expérimentation) est donc prévue sur cette période de 1 an.

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de papier dans chaque cage pour leur permettre la conception d'un « nid »), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

3003. L'électro-perméabilisation (EP) est une méthode physique qui consiste en l'application d'un champ électrique externe à l'aide de 2 électrodes. Cette technique conduit à la perméabilisation des cellules du tissu ciblé (entre les électrodes) et facilite l'entrée de molécules au sein des cellules perméabilisées. Dans le cas de l'application d'un champ électrique de très haute tension (kV), on parle alors d'électro-perméabilisation irréversible (IRE). Plusieurs études ont montré que l'IRE pouvait éliminer des volumes substantiels de tissus traités par un effet non thermique, et notamment dans des tumeurs. Par ailleurs, des études précliniques et cliniques ont permis de mettre en évidence que l'expression d'une cytokine (IL-12) au niveau de la tumeur pouvait aussi conduire à une diminution de la tumeur traitée. Cependant, dans les deux cas, les paramètres électriques n'ont pas fait l'objet d'investigations poussées et les deux approches ne suffisent pas à éradiquer les tumeurs à elles seules. De plus, la combinaison des deux approches, qui pourrait conduire à un effet synergique sur la diminution voire l'élimination des tumeurs, reste à explorer.

Dans une étude préliminaire, nous avons défini des conditions électriques optimales pour tuer les cellules tumorales B16F10 (mélanome murin) *in vitro* (amplitude, nombre, durée et fréquence des impulsions). Une première étude *in vivo* a été réalisée sur un très petit nombre d'animaux pour confirmer l'effet de l'IRE sur la croissance de tumeurs B16F10 sous-cutanées.

A présent, nous souhaitons optimiser les paramètres électriques sur un plus grand nombre d'animaux et coupler l'IRE à une électro-immuno-géno-thérapie en électro-transférant à proximité de la tumeur un plasmide codant l'IL-12 qui induira ainsi une réponse immunitaire pouvant potentialiser la réponse anti-tumorale initiée par l'IRE. Les paramètres électriques optimaux de transfert pour un plasmide restent à déterminer pour obtenir une expression de l'IL-12 efficace au niveau de la peau. La combinaison IRE sur la tumeur et EP de l'IL-12 sur la peau devrait conduire à une régression tumorale significative et à un effet sur les métastases ou nodules non traités.

Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation de 2332 souris. Le nombre d'animaux utilisés dans le projet est réduit à son minimum pour obtenir dans chaque groupe étudié un nombre d'individus suffisants pour réaliser les tests statistiques. Quand cela est possible, les différentes parties du projet sont regroupées pour réduire le nombre de groupes observés. Les conditions d'hébergement et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute angoisse des animaux. L'utilisation de la fluorescence couplée à l'imagerie non invasive va permettre de suivre dans le temps un même animal. Ceci réduit considérablement le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

3004. L'objectif de ce projet est de suivre en imagerie des tumeurs murines de cancer du rein sous chimiothérapie. En effet, les tumeurs cancéreuses souffrent d'un manque d'oxygène car leurs vaisseaux sont souvent inadéquats par rapport à leurs besoins. Cette condition, appelée hypoxie, est associée à une agressivité plus marquée, à une augmentation du risque de dissémination (métastase) et à une moins bonne réponse aux traitements. Il est donc important de pouvoir détecter et quantifier le degré d'hypoxie des tumeurs.

L'imagerie permet de mesurer l'hypoxie par des techniques innovantes, telles que l'imagerie par Résonance Paramagnétique Electronique (RPE), détectant les électrons ; l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), déjà utilisée chez l'Homme, qui permet elle aussi de quantifier l'oxygénation des tumeurs par des techniques indirectes (IRM BOLD estimant l'oxygénation à partir d'un produit de dégradation de l'hémoglobine, transporteur de l'oxygène dans le sang) et la qualité de leur vascularisation (IRM de perfusion ou DCE).

Nous injecterons des cellules tumorales du cancer rénal à 30 souris.

Nous réaliserons deux groupes de souris, l'un recevant le traitement, l'autre un placebo, puis étudierons par ces différentes techniques d'imagerie (RPE, IRM BOLD et DCE) l'oxygénation et la perfusion tumorale. Après l'euthanasie des souris, les résultats obtenus seront comparés aux données histologiques, afin de valider ce qui est visualisé en imagerie. Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

3005. L'asthme est une maladie chronique d'origine souvent immunologique, hétérogène et présentant différents phénotypes et réponses aux traitements. Dans les cas les plus sévères, l'asthme déclenche des exacerbations, peu ou pas contrôlées par les thérapeutiques disponibles, notamment à base de corticoïdes. L'asthme est caractérisé par une inflammation et un remodelage des voies aériennes et par une hyper-réactivité bronchique, autant d'évènements responsables d'anomalies fonctionnelles respiratoires et d'une détérioration significative de la qualité de vie. L'asthme touche plus de 300 millions de sujets dans le monde.

La priorité de ce projet est de mieux comprendre les processus immunitaires impliqués dans le déclenchement et dans la sévérité des réponses inflammatoires pulmonaires observés dans l'asthme allergique. Dans ce but, nous procéderons à l'administration intra-nasale d'extraits d'acariens de la poussière de maison à des souris génétiquement modifiées afin d'obtenir un modèle expérimental d'asthme allergique. Nous suivrons différents paramètres physiologiques et immunitaires chez les souris asthmatiques, dont l'hyperréactivité bronchique.

Un problème important de santé publique est l'exacerbation de l'asthme chez les patients atteints d'infections virales comme la grippe. Pour mieux comprendre ce processus inflammatoire nous allons administrer aux souris asthmatiques des produits qui miment une activation virale afin d'induire un modèle plus sévère d'asthme allergique proche à certaines conditions humaines.

Les expériences proposées nécessiteront l'utilisation de 1544 souris pour la période de 5 ans, soit approximativement 300 souris par an. Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement élaborés afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et statistiquement valables. Compte tenu du fait que le groupe contrôle non asthmatique, selon notre expérience, est assez homogène nous réduirons le nombre d'animaux par groupe. De plus, un effort important sera fait pour regrouper les expériences afin qu'un même groupe de souris puisse être utilisé comme contrôle pour deux expériences réduisant ainsi le nombre d'animaux.

Nous nous attachons également à réduire au maximum la souffrance des souris. Elles seront observées quotidiennement. Si une souris perd plus de 20 % de sa masse corporelle, elle sera euthanasiée.

Pour conclure, le projet nous permettra de mieux comprendre les mécanismes immuns impliqués dans la sévérité de l'asthme allergique et de proposer de nouvelles thérapeutiques pour traiter la pathologie humaine.

3006. Les pathologies de l'ovaire résultent de dysfonctionnement des gènes nécessaires à la formation de l'ovaire. La voie génétique de signalisation WNT est essentielle à différentes étapes du développement de cet organe. Il a été montré que le stock définitif de follicules ovariens est établi avant la puberté. Les follicules nourrissent les cellules reproductrices ou ovules et un stock anormalement faible de follicules conduit à l'insuffisance ovarienne précoce et à l'infertilité. Cette pathologie affecte 1 femme sur 1000 de moins de 30 ans. A l'heure actuelle, on connaît peu les mécanismes qui permettent l'établissement du stock de follicules ovariens. Les gènes FOXL2 et Nobox sont importants pour l'établissement de ce stock et le gène Rspo2 est un des gènes principaux qu'ils régulent. Les mutations hétérozygotes de Rspo2 induisent la formation de kystes ovariens et les mutations homozygotes de ce gène résultent en une détresse respiratoire responsable de la mort des fœtus dans les heures suivant leur naissance. Cela empêche de déterminer le rôle de Rspo2 dans l'établissement du stock de follicules ovariens.

A l'heure actuelle, la morphogenèse de l'ovaire nécessite une étude dans un modèle animal car il n'existe pas de modèle in vitro recréant les conditions de formation de l'ovaire. Cela est dû en particulier à la variété de cellules qui sont impliquées dans la formation de cet organe. Nous avons débuté ce projet dans un souci de respecter la règle des 3R visant à remplacer les souris. Nous avons réalisé des cultures d'ovaire mais celles-ci induisent la dégénérescence des cellules due au manque d'échanges sanguins. Nous avons ensuite essayé des greffes d'ovaires de souris dans des œufs de poule pour fournir un milieu vascularisé, mais cela ne permet pas d'obtenir des résultats satisfaisants, la cinétique de développement des deux espèces étant trop différente. Nous sommes donc obligés d'utiliser un modèle murin récapitulant la pathologie humaine. Nous prélèverons des ovaires de fœtus de souris déficientes pour Rspo2 avant leur mort et les grefferons chez des souris mâles immuno-réprimés, receveuses âgées de 2 à 4 mois afin d'étudier les anomalies du développement ovarien dues à l'ablation de Rspo2. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos analyses sur les échantillons prélevés. Dès que nous atteindrons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure nos résultats de façon significative, nous arrêterons nos expérimentations. Dans un but de raffinement du bien être des souris, nous administrerons des antalgiques en post-opératoire pour prévenir toute douleur. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 16 souris transgéniques et 24 souris receveuses soit un total de 40 souris. Ces résultats nous permettront de définir le rôle de Rspo2 dans la formation de l'ovaire et les pathologies comme les insuffisances ovariennes précoces.

3007. L'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de la transplantation de microbiote fécal sur l'éradication de la colonisation digestive à entérobactéries productrices de carbapénémases (E coli producteur de carbapénémase ou EPC) dans un modèle murin. Le but est d'éradiquer ces bactéries hautement résistantes du microbiote digestif. Pour ce faire nous utiliserons un modèle de colonisation digestive à bactérie hautement résistante émergente (BHRe) chez la souris SWISS tel qu'il est observé chez l'homme en cours d'hospitalisation. Les patients hospitalisés porteurs de BHRe de type entérobactéries restent porteurs très longtemps après leur hospitalisation et ce portage représente un facteur de risque d'infection par ces bactéries notamment en cas de ré hospitalisation. La prise d'antibiotiques favorise cette colonisation prolongée ou l'émergence de ces BHRe au sein du microbiote.

L'administration d'antibiotique dans ces conditions est donc contre-productive.

L'utilisation de souches bactériennes entrant en compétition avec ces bactéries hautement résistantes est une méthode d'éradication qui a déjà prouvée son efficacité dans les infections récidivantes à *Clostridium difficile*. La méthode consiste à prélever une partie du microbiote digestif d'un individu possédant une flore bactérienne équilibrée pour le transplanter à un autre individu ayant une flore déséquilibrée. Cela consiste à recueillir des selles, en faire l'analyse puis à les instiller dans le tube digestif par fibroscopie ou coloscopie du sujet transplanté.

360 souris sur 5 ans seront nécessaires à ce projet, afin de respecter la règle des 3 R :

-Remplacer : le recours aux animaux est limité à la souris car les données actuelles sur la Transplantation de Microbiote Fécal ne permettent pas encore d'envisager un essai thérapeutique chez l'homme, le modèle animal se révèle essentiel pour les modalités d'évaluations

-Réduire : le modèle choisi est destiné à limiter le nombre d'animaux : afin de justifier de la validité et la reproductibilité des résultats obtenue, et pour les analyses statistiques ultérieures, un minimum de 15 souris par lot est nécessaire

-Raffiner : Le bien-être de l'animal est pris en compte de manière à lui éviter toute souffrance inutile (expérimentation nécessitant gavages et recueil de selles). Chaque cage est enrichie avec un jouet (type cabane).

3008. L'objectif de nos recherches est de comprendre comment le cervelet intègre et traite les informations qu'il reçoit de l'ensemble du corps afin de contrôler la coordination motrice. Nous enregistrerons in vivo les différents types cellulaires du cortex cérébelleux et procéderons à des stimulations et des perturbations des réseaux neuronaux pour déterminer les règles de traitement des informations. Nous utiliserons des outils activables par la lumière (techniques d'optogénétique) que nous ferons s'exprimer spécifiquement dans certains types cellulaires, ce qui permettra d'activer ou d'inhiber les réseaux neuronaux.

Les différents types de protéines photoactivables seront exprimés dans les neurones d'intérêt soit par transgénèse, soit via une injection virale de pseudo adenovirus. Leur activation sera réalisée par le déclenchement d'une lumière bleue à travers une fibre optique positionnée à la surface du cerveau ou dans le tissu. L'étude du traitement de l'information dans les différents types cellulaires du cortex cérébelleux nous permettra de comprendre leur rôle dans la coordination motrice liée au cervelet. L'utilisation de l'électrophysiologie in vivo sur la souris est nécessaire dans notre cas car l'étude doit s'effectuer sur un circuit intact pouvant impliquer des aires corticales situées à une grande distance (système impossible à reconstituer avec des techniques de remplacement de type culture cellulaire par exemple). Les tests comportementaux couplés à des stimulations (lumineuses dans notre cas), permettront de comprendre l'implication des cellules du cervelet lors de tâches nécessitant des traitements de haut niveau (apprentissage moteur, conditionnement, etc.). L'utilisation des souris transgéniques couplée à l'électrophysiologie in vivo et à des tests comportementaux permettra de développer des protocoles de stimulation dans le but de compenser des pathologies cérébelleuses de type ataxie, mouvements anormaux ou tremblements.

L'utilisation de l'optogénétique permet de réduire le nombre d'animaux utilisés, car l'expression spécifique des protéines photoactivable limite le risque d'erreur de ciblage des outils et permet d'éviter des approches lésionnelles ou douloureuses. Après vérification de l'innocuité des transgènes, les animaux deviennent leur propre contrôle, ce qui permet de limiter le nombre de groupes d'étude. L'utilisation de l'optogénétique permet également de raffiner les protocoles de stimulation afin d'accumuler un grand nombre d'informations sur un minimum d'animaux. Les expériences prévues dans ce projet seront conduites sur des cohortes d'animaux maintenus en groupe dans leur cage et toutes nos chirurgies seront réalisées avec un niveau d'analgésie maximal.

Enfin, une partie des travaux sera réalisé in silico, en particulier pour la prédiction des paradigmes utilisés pour la stimulation et pour l'interprétation des règles de codage de l'information.

5 lignées d'animaux transgéniques seront utilisées en plus d'animaux sauvages afin de cibler les différents types cellulaires et activer les entrées du cortex cérébelleux. 2 sont déjà présentes au laboratoire et 3 sont en cours de création par notre consortium (ANR CeMod). Nous utiliserons au cours de ce projet ANR qui durera 5 ans, 100 animaux par an et par lignée soit 2500 animaux au total.

3009. Des anticorps polyclonaux sont indispensables en biologie, notamment pour la réalisation de kits diagnostics. Ces anticorps polyclonaux sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense en réponse à l'injection d'un immunogène spécifique. Les immunogènes (Ag) sont des substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques.

Nous assurerons la production d'anticorps polyclonaux pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Remplacer : La purification des anticorps nécessite une phase de production sur l<sup>1</sup>animal car il n'existe pas de système in vitro permettant de produire des anticorps polyclonaux.

Réduire : Le mouton est particulièrement adapté à ces projets nécessitant une quantité importante d<sup>1</sup>Ac pour la production de réactif. Il permet ainsi de Réduire le nombre d<sup>1</sup>animaux engagés dans chaque protocole : un seul animal est nécessaire par antigène.

Raffiner : l<sup>1</sup>animal immunisé est maintenu en bergerie conventionnelle avec ses congénères pour assurer un enrichissement social. L<sup>1</sup>utilisation d<sup>1</sup>adjuvant de Freund incomplet à chaque immunisation permet de limiter le degré de gravité de la procédure d<sup>1</sup>immunisation.

Chaque protocole d<sup>1</sup>immunisation ne concernera qu<sup>1</sup>un animal. Au cours des 5 ans de validité de cette demande, 5 animaux au maximum seront immunisés en fonction des besoins."

3010. Malgré une formidable explosion des connaissances, le taux de développement de nouveaux médicaments innovants dans le domaine des maladies psychiatriques est faible et de nombreux symptômes restent encore insensibles aux traitements.

Les études chez l'animal sont d'une importance majeure pour une meilleure compréhension des bases neurobiologiques de la maladie et ouvrent la possibilité de tester certaines interventions à visée thérapeutique.

Chez le rongeur, de nombreux tests comportementaux existent afin d'évaluer les effets de substances pharmacologiques sur l'activité motrice, les comportements de type « dépression » ou « schizophrénie » et l'anxiété. Cette approche comportementale qui n'est possible qu'à l'échelle de l'organisme entier et ne peut être reproduite in vitro ni ex vivo sera utilisée afin de tester des composés visant de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour ces expériences un total de 920 rats sera être utilisé. Un tel effectif est nécessaire afin de disposer d'effectifs suffisants pour permettre des comparaisons statistiques cohérentes dans chacun des tests comportementaux utilisés. Ces expériences ont été conçues de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux à utiliser. Ce projet s'effectuera dans le respect de la règle des 3R, en veillant au bien-être des animaux et en limitant leur douleur.

3011. Chez les mammifères, espèce humaine comprise, la vie reproductive de la femelle se caractérise par de nombreux bouleversements physiologiques survenant lors de l'accouplement, la gestation, la mise-bas et l'allaitement. Ces changements physiologiques s'accompagnent de modifications au niveau du système nerveux central, appelée plasticité cérébrale, indispensable à la mise en place de comportements sexuel ou maternel adaptés. Jusqu'à présent cette plasticité cérébrale n'a été étudiée que dans certaines régions du cerveau et par des approches cellulaires, n'offrant ainsi qu'une vue parcellaire des mécanismes en jeu. Afin d'accéder à une analyse plus longitudinale et dynamique nous voulons, grâce à l'imagerie cérébrale, explorer par une approche non invasive d'Imagerie par Résonance Magnétique anatomique, cette plasticité cérébrale survenant au cours de la vie reproductive. A cette fin, nous utiliserons le modèle de la brebis qui est un modèle de référence dans le domaine de la physiologie de la reproduction et de la neurobiologie des comportements sociaux. Cette étude constituera une avancée dans la compréhension des mécanismes de plasticité cérébrale indispensables à l'adaptation comportementale.

Cette étude utilisera 35 brebis réparties en 2 groupes: un groupe expérimental de 20 femelles qui suivront toutes les étapes de la fécondation à la lactation et un groupe témoin de 15 femelles qui sera imagé au même moment, afin de tenir compte des variations liées à la saison ou à l'âge des animaux. La règle des 3 R sera appliquée à ce protocole de la manière suivante. Tout d'abord, en termes de remplacement, aucune méthode substitutive ne permet de se passer de l'expérimentation animale et de restituer la complexité des phénomènes observés ici (plasticité cérébrale au cours de la fécondation, de la gestation et de la lactation). En terme de raffinement, l'utilisation d'approches d'IRM nous permettra d'éviter le sacrifice des animaux qui pourront réintégrer, à la fin de l'étude, le troupeau expérimental de l'unité. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes sociaux sur paille, soit dans des conditions standards d'élevage. Enfin, sur le plan de la réduction, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au plus juste en prenant en compte les contraintes des techniques d'imagerie (traitement statistique avec des modèles paramétriques).

3012. Ce projet a pour but principal d'étudier les effets des lésions du cervelet sur l'addiction à la cocaïne. En effet, cette région du cerveau surtout connue pour son rôle dans les mouvements et la coordination, semble aussi jouer un rôle primordial dans les désordres psychiatriques. Des recherches récentes chez les rongeurs suggèrent que le cervelet participe au contrôle de la prise de drogue et au passage d'un usage récréationnel à un usage compulsif.

Dans ce projet, nous allons tester si la lésion du cervelet altère le comportement de prise de cocaïne à différents stades de l'addiction.

Ce projet comporte 3 procédures :

La procédure 1 correspond à une chirurgie pour induire des lésions de régions discrètes du cervelet.

La procédure 2 correspond à une chirurgie qui permettra l'implantation chronique d'un cathéter dans la veine jugulaire des rats.

La procédure 3 correspond à l'auto-administration (grâce à ce cathéter) de la cocaïne dans des cages opérantes. Des animaux témoins auront la possibilité de consommer de la nourriture à la place de la drogue.

L'ordre chronologique des 3 procédures variera en fonction de la question que nous poserons. En effet, pour étudier les effets d'une lésion du cervelet sur la mise en place de l'addiction à la cocaïne, la procédure 1 de lésion précèdera la procédure 2 de

cathétérisation et la procédure 3 de prise de drogue. Inversement pour étudier les effets d'une lésion du cervelet sur la maintenance de l'addiction, son aggravation et la rechute la procédure 2 et 3 précéderont la procédure 1 de lésion.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, peut uniquement être menée sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé, que pour cette étude, 288 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement.

Cette recherche est innovante et a le potentiel de fournir des informations critiques pour la compréhension de l'addiction, informations qui peuvent amener à une meilleure prise en charge de cette maladie chez l'homme.

3013. Chez l'individu sain, les Exercices de longue durée (type Continu) et d'Intensité Modérée (ECIM) modifient les cellules ventriculaires cardiaques (cardiomyocytes), en améliorant leurs capacités contractiles (remodelage physiologique). L'amplitude des effets observés dépend de l'intensité d'exercice. Il a été démontré sur le rat insuffisant cardiaque post infarctus que le remodelage pathologique (augmentation de la taille des cardiomyocytes, fibrose et diminution de la contractilité) était inversé par des Exercices Intermittents à Haute Intensité (EIHI). Il se produit alors une diminution de la taille des cardiomyocytes, une amélioration de la contractilité et une stimulation d'acteurs du couplage excitation-contraction et des mouvements calciques. L'hypertension artérielle (HTA) peut également conduire à des atteintes cardiaques menant à un remodelage pathologique. On peut se demander si les EIHI sont capables de limiter voire empêcher le remodelage pathologique. Le but du projet est donc de comprendre les mécanismes cellulaires de ce remodelage cardiaque induit par deux types d'entraînement physique (ECIM et EIHI) sur un modèle de rat hypertendus (Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)). La souche SHR fût développée au Japon en 1963. Pour cela, il a été réalisé des accouplements entre un mâle Wistar consanguin présentant une élévation importante de la pression artérielle et une femelle ayant une pression artérielle légèrement élevée. Des croisements entre frères et sœurs ont ensuite été réalisés afin de conserver l'hypertension spontanée. La principale caractéristique du rat SHR est une hypertension marquée avec une physiopathologie proche de celle de l'Homme. Par exemple sa pression systolique moyenne évolue au cours du temps en passant de 110 mmHg à 8 semaines d'âge à 195 mmHg à 16 semaines. Lors de cette étude, 60 animaux SHR seront utilisés et répartis en trois groupes, un groupe contrôle de 20 rats qui ne subiront pas d'entraînement, un groupe de 20 rats qui subiront des entraînements ECIM et un groupe de 20 rats qui subiront des entraînements EIHI. 20 rats Wistar Kyoto (WKY) non entraînés seront également utilisés, il s'agit de témoins normotendus du rat SHR. Les rats sont hébergés dans une animalerie agréée en milieu enrichi à 2 par cage. La règle des trois R a été mise en application, dans la limite des possibilités pratiques, de la façon qui suit. Remplacement : il n'est pas possible du fait de la nature même de l'étude proposée (effet de l'entraînement physique) de remplacer les animaux par d'autres types d'expérimentation. Raffinement visant à éviter une souffrance éventuelle inutile des animaux: une surveillance et une observation quotidienne du comportement des animaux sont assurées et une pesée hebdomadaire permet de s'assurer de la bonne santé des animaux durant l'ensemble du protocole. Réduction du nombre d'animaux : le nombre des animaux a été ajusté (par calcul statistique) au nombre minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs.

3014. Les thérapies médicamenteuses conventionnelles exploitent les propriétés toxiques d'agents anticancéreux. Ils agissent principalement sur les cellules tumorales mais parfois sur les cellules saines, provoquant des effets secondaires responsables de l'arrêt des traitements chez les patients. Depuis quelques années, des stratégies de chimiothérapies ciblant les cellules tumorales ont émergé afin de véhiculer un agent anticancéreux vers la tumeur sous la forme d'un médicament non-toxique, puis de régénérer son activité toxique au niveau de la tumeur. De tels agents sont appelés vecteurs anticancéreux ou médicaments anticancéreux.

Ainsi, nous créons des médicaments capables d'activer leur activité toxique uniquement après reconnaissance de marqueurs membranaires présents à la surface des cellules tumorales ou d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. Lors de précédentes études, notre laboratoire a démontré l'activité d'une première génération de vecteurs anticancéreux in vivo chez la souris. Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ces mêmes vecteurs comme référence afin d'évaluer le potentiel anticancéreux de nouvelles générations de vecteurs dérivés de ceux de première génération.

Comme mentionné plus haut, les vecteurs anticancéreux de référence ont déjà été évalués sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les protocoles expérimentaux.

Un total de 360 souris sera nécessaire pour mener à bien l'ensemble du projet.

Par une approche statistique, la « Règle des 3 R » établie par Russel et Burch, a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences. Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées au mieux afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffinement). Compte tenu des avancées de nos travaux in vitro, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro.

A terme, ces expériences nous permettront d'évaluer tout le potentiel thérapeutique de cette nouvelle génération de médicaments anticancéreux intelligents afin de pouvoir identifier celui ou ceux qui peuvent être accompagnés dans une étude clinique de phase 1 chez l'homme.

3015. Afin d'améliorer la durabilité de la production aquacole d'espèces carnivores (régime alimentaire est basé sur la consommation de chairs ou de tissus d'animaux vivants ou morts) comme les salmonidés, il est essentiel de réduire la part de farine de poisson, issue des pêches minotières, dans les aliments aquacoles. L'augmentation de la part de glucides digestibles dans l'aliment semble être une bonne option tant d'un point de vue économique qu'environnemental. Toutefois, la truite est considérée comme un carnivore strict, utilisant comme principale source d'énergie les protéines alimentaires et faiblement adaptée à l'utilisation des glucides. Les conséquences en sont que lorsque la farine de poisson est substituée à plus de 20% par les glucides digestibles, cette espèce présente des baisses de performance de croissance et une hyperglycémie (une concentration en sucre dans le sang anormalement élevée) postprandiale persistante, définissant cette espèce comme intolérante au glucose. Une stratégie permettant d'adapter les animaux à leur futur environnement nutritionnel, i.e. riche en glucides digestibles ici, repose sur la programmation nutritionnelle précoce par un stimulus strictement nutritionnel ou non. La programmation repose sur le fait qu'un stimulus appliqué durant une période de plasticité métabolique sera enregistré par l'organisme et agira sur son phénotype à venir (ensemble des caractères observables d'un individu) comme cela est bien décrit chez les mammifères durant la gestation ou chez les abeilles pour expliquer les différences entre les reines et les ouvrières. Afin de programmer le métabolisme glucidique (ensemble des réactions chimiques qui se déroulent au sein d'un être vivant liées à l'utilisation des glucides) chez la truite et améliorer son utilisation des glucides alimentaires, nous proposons ici l'application précoce d'un stimulus avant le premier repas donc forcément non nutritionnel (il a été prouvé précédemment qu'un seul stimulus nutritionnel lors de l'alimentation précoce n'est pas suffisant pour programmer ce métabolisme) : l'hypoxie (diminution de la quantité d'oxygène) combinée à un stimulus hyperglycémique lors de la nutrition précoce. Les conditions d'hypoxie appliquées sont modérées et n'affecte pas la survie ni la croissance des poissons. Au total 1314 poissons seront utilisés. Les analyses d'expression de gènes/ d'activité enzymatiques (évaluation des synthèses chimiques et de réactions aboutissant à la production d'une protéine et à son activité) / de mécanismes relatifs au métabolisme glucidique seront faites sur des truites d'élevage (12 alevins par condition ou 9 juvéniles de 70g par condition) sous deux conditions d'hypoxie (et un témoin en normoxie, niveau d'oxygène normal) et un régime riche en glucides digestibles (témoin avec un régime sans glucide). Remplacement: les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme glucidique et meilleure utilisation des glucides alimentaires) ne peuvent être observés qu'in situ. Raffinement : aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants Réduction : le nombre de poissons prélevés est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures.

3016. Le virus de la leucémie lymphoïde T de l'adulte (HTLV, Human T cell Leukemia/Lymphoma virus en anglais) infecte 10 à 20 millions de personnes chaque année dans le monde. Le virus persiste dans l'organisme de l'individu infecté jusqu'à la fin de sa vie et se transmet par voie sexuelle, sanguine ou par transmission verticale fœto-maternelle. Il n'y a pas d'atteinte symptomatique, sauf pour 5% des personnes infectées par HTLV qui développent un cancer très agressif de type leucémie, l'ATLL (Adult T-cell Leukemia/Lymphoma), à évolution rapide et résistant à la chimiothérapie, avec une survie inférieure à un an. 35 ans après la découverte de ce virus, il n'existe à ce jour aucun traitement ou vaccin pour ce cancer. Les objectifs de ce projet sont d'évaluer l'innocuité, l'immunogénicité et l'efficacité de candidats vaccins anti-HTLV. Les candidats vaccins ont été présélectionnés in vitro, puis chez le rongeur et enfin seront évalués chez le primate non humain (PNH). Le PNH, et plus particulièrement le macaque, est sensible à l'infection par le virus HTLV et seul modèle in vivo représentatif de l'infection HTLV humaine à l'heure actuelle. Son système immunitaire permet également d'évaluer les différentes composantes des réponses immunitaires induites par la vaccination anti-HTLV. L'objectif de la vaccination est d'empêcher l'entrée du virus HTLV dans ses cellules cibles et de détruire les cellules infectées. Le projet prévoit au maximum 30 PNH nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang, de fluides muqueux et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des échantillons biologiques produits dans ce projet seront partagés avec d'autres laboratoires afin de limiter le recours au modèle PNH. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Les animaux seront hébergés par paires avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

3017. La cholangite sclérosante primitive (CSP) est une maladie biliaire fibrosante pour laquelle il n'existe actuellement aucun traitement médical. L'objectif de notre projet est de vérifier l'hypothèse selon laquelle l'activation du récepteur membranaire des acides biliaires TGR5, a un rôle protecteur dans la CSP. Pour vérifier cette hypothèse, nous étudierons l'effet d'un agoniste de TGR5 dans le modèle murin le mieux établi de CSP, les souris invalidées pour Abcb4. Nous évaluerons les conséquences de ce traitement sur les manifestations de la CSP, notamment la fibrose biliaire. Une telle recherche à visée thérapeutique ne pouvait être abordée que par l'analyse d'un modèle animal de CSP comme les souris invalidées génétiquement pour Abcb4. Type d'animaux : Souris Abcb4-/- sur fond FVB/n. Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 168 souris pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé tout en respectant les principes de remplacement, de

raffinement et de réduction décrits au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Un système vivant est nécessaire pour étudier les phénomènes mis en jeu dans le développement de la CSP. Il n'est pas possible de recréer *in vitro* la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu dans la CSP.

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. Au cours de ce projet, un objectif de réduction du nombre des animaux engagés sera poursuivi avec insistance de par l'analyse des données générées en continue.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification. 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. De plus, une démarche en constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des protocoles décrit dans la saisine.

3018. Dans le cadre de ses activités de recherche pour l'industrie pharmaceutique, notre entreprise propose ses services à des sociétés tiers dans le domaine de l'évaluation de la pharmacocinétique de composés d'intérêt pharmacologique.

Notre société propose l'évaluation de la pharmacocinétique de composés sur des modèles *vitro* et *vivo*. L'évaluation *vitro* permet de réduire le nombre de composés à tester chez l'animal mais l'évaluation sur l'animal reste indispensable sur les composés les plus prometteurs. En effet, la complexité des mécanismes d'Administration/ Distribution/ Métabolisme/ Elimination ne peut se faire que sur des animaux.

Les procédures expérimentales de ce projet sont de courtes durées (de quelques heures à 3 jours) et les animaux ne développent pas de signes cliniques. Compte tenu de l'expérience acquise dans ce domaine, nous prévoyons d'utiliser environ 4 000 animaux sur 5 ans (2 500 souris, 1 250 rats et 250 lapins). Cette estimation est une valeur haute, le nombre d'animaux pourra varier de manière importante en fonction de la demande des clients.

Toutes les dispositions nécessaires en matière d'hébergement, d'observation et de soins aux animaux sont prises afin d'assurer les meilleures conditions de vie aux animaux.

3019. Le facteur de transcription HNF-4 alpha est exprimé dans le foie, le rein, le pancréas et l'intestin. Il contrôle l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme glucido-lipidique hépatique et pancréatique. Maturity Onset Diabetes of the Young (MODY) 1 est un diabète dû à des mutations du gène HNF-4 alpha. Il existe une autre forme, codée par un gène différent, la forme HNF-4 gamma qui est exprimée aussi dans l'épithélium intestinal, le pancréas mais pas le foie et dont la fonction reste peu connue.

Nos objectifs sont d'analyser les rôles respectifs de chacune des formes de HNF-4, alpha et gamma dans l'homéostasie énergétique en réponse à un environnement nutritionnel induisant une obésité et un diabète de type 2.

Nous utilisons pour l'ensemble de ce projet :

Pour l'étude du rôle spécifique de HNF-4 alpha : un modèle de souris transgénique d'inactivation conditionnelle et tissu spécifique du gène HNF-4 alpha ainsi que la lignée contrôle. Ces lignées sont déjà établies.

Pour l'étude du rôle spécifique de HNF-4 gamma : un modèle d'inactivation totale et constitutive du gène HNF-4 gamma déjà établi ainsi que la lignée C57Bl6/J fournie par des établissements agréés.

Double inactivation : nous avons établis au laboratoire un modèle de double inactivation de HNF-4 alpha et gamma en croisant les lignées précitées.

L'ensemble de ce projet nous permettra de déterminer quels sont les rôles respectifs de HNF-4 alpha et HNF-4 gamma dans la susceptibilité à l'obésité et au diabète de type 2.

Remplacement impossible : Notre objectif est d'étudier les rôles physiologiques des 2 formes d'HNF-4 dans le métabolisme énergétique, ce qui nécessite une approche *in vivo*. Les différentes procédures (1 à 5) sont appliquées au même groupe de souris pour une expérience. Il y a ainsi respect du principe de Réduction du nombre des animaux grâce au Raffinement des protocoles et des conditions d'élevage.

Nombre d'animaux expérimentés utilisé pour le projet : 180

3020. L'efficacité de la majorité des traitements anti-tumoraux réside dans l'élimination de la totalité des cellules tumorales par des effets cytotoxiques directs. Cependant, les thérapies conventionnelles ne remplissent pas toujours cet objectif et sont associées à une lourde morbidité. Récemment a été démontrée que la mort cellulaire induite par certains médicaments anti-tumoraux conventionnels (anthracyclines) pouvait générer une réponse immunitaire anti-tumorale participant de façon synergique à l'efficacité thérapeutique. L'utilisation de méthodes de génotypage à haut débit nous a permis d'identifier un polymorphisme du gène, FPR1 (Formyl Peptide Receptor 1), impliqués dans l'efficacité de la chimiothérapie. La présence de ce polymorphisme a été corrélée à une plus faible survie chez des patients atteints de cancer du sein recevant des anthracyclines. Le but de ce projet est de caractériser la fonction de ce polymorphisme *in vivo*. Ce projet complète le cadre expérimental du projet n.3941.01 déjà autorisé (« Etude de la fonction du gène FPR1 dans l'efficacité de la chimiothérapie »). Cette question ne peut être abordée qu'*in vivo* car il n'est pas possible d'étudier l'implication du système



immunitaire sur le contrôle de la croissance tumorale dans des systèmes in vitro. Nous souhaiterions effectuer cette étude en utilisant des souris C57Bl/6 (n. 705) et aussi des souris transgéniques C57Bl/6 Fpr1-/- (n.160), accessible dans le commerce et qui présentent un phénotype complètement normal. Ce projet se dessine sur 5 ans et implique des expériences de vaccination et croissance tumorales. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des expérimentations a été mis au point afin de respecter les exigences de remplacement, réduction et raffinement pour permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. L'étude sera arrêtée si la procédure initiale invalide l'hypothèse de travail. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Ce projet vise à une meilleure compréhension de la fonction de FPR1, un facteur pronostique négatif pour la réponse aux traitements anticarcéaux à base d'anthracyclines, afin d'orienter la conception de nouvelles stratégies thérapeutiques chez les patients atteints de cancer du sein. Nous préconisons que l'accomplissement de ce projet fournira des connaissances sur la régulation de la réponse immunitaire aux cancers pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées.

3021. La prévalence actuelle des maladies neurodégénératives (Maladies d'Alzheimer, de Huntington, de Parkinson ainsi que la démence vasculaire et les tauopathies), déjà élevée, ne peut qu'augmenter puisque l'âge est le principal facteur de risque et qu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer les capacités cognitives. Cette situation impose à notre société un problème de santé publique d'une extrême acuité, nécessitant notamment des budgets de plus en plus lourds pour résoudre l'équation médicale, sociale et financière permettant de répondre à une demande de soins croissante et de faire face à la dépendance. La découverte de nouveaux traitements pour les maladies neurodégénératives, est donc, un des enjeux socio-économiques majeurs et un challenge primordial pour les industriels de la pharmacie.

Ce projet a pour but de valider des stratégies thérapeutiques innovantes pour ces maladies. Afin d'optimiser l'efficacité des criblages de molécules, de réduire les risques d'échec des expérimentations chez l'animal et de diminuer le nombre d'animaux (réduction) impliqués dans les études précliniques et le coût des études, les candidats médicaments potentiels sont évalués in vitro sur culture primaire de neurones du cortex, d'hippocampe ou du striatum ; issus d'embryons de souris ou de rat (âgés de 16 et 17 jours respectivement), en fonction des recommandations des propriétaires des composés testés. L'utilisation des embryons de cet âge là permet à la fois de disposer de neurones différenciés, sains et fonctionnels (contrairement à la plupart des lignées neuronales disponibles) et d'empêcher la prolifération des cellules gliales grâce à des traitements adaptés. Ce type de culture est sensible aux oligomères solubles de peptide A $\beta$  (A $\beta$ Os), à la huntingtine, à l'homocystéine, à la protéine Tau et à l' $\alpha$ -synucléine ; agents neurotoxiques responsables de la maladie d'Alzheimer, de la maladie d' Huntington, de la démence vasculaire, des tauopathies et de la maladie de Parkinson respectivement. Ces expériences sont réalisées en quadruplicate et en dose-réponse sur des neurones cultivés en plaques 48 puits (miniaturisation de l'essai afin de réduire le nombre de cellules et donc d'animaux à utiliser).

Ce projet de 5 ans nécessite 250 rates et 500 souris gestantes, soit 2000 embryons de rat et 3000 de souris. Nous récupérerons de chaque embryon le striatum, l'hippocampe et le cortex afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés (réduction).

3022. Les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson sont des maladies liées au vieillissement, caractérisées par des troubles de différents types de mémoire (mémoire épisodique, mémoire topographique, mémoire des objets, etc.).

Le déficit en mémoire visuelle d'objets est déficitaire dans les phases précoces de la maladie d'Alzheimer et peut être prédictif de la conversion de patients présentant des troubles cognitifs légers en patient souffrant de maladie d'Alzheimer. Ce déficit est lié au fonctionnement d'une zone de cerveau défini (le cortex périrhinal) chez l'homme et chez le rongeur. Dans la maladie d'Alzheimer, la pathologie se développe dans certaines zones du cerveau d'abord dans le cortex périrhinal et le cortex enthorinal (une autre zone du cerveau) avant d'atteindre l'hippocampe. Le déficit en mémoire topographique, lié à un dysfonctionnement de l'hippocampe, est aussi une des caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.

Le but de ce projet est de développer et valider le modèle de reconnaissance d'objet et celui de mémoire topographique en utilisant des souris C57BL/6J naïves, souche la plus utilisée pour les tests cognitifs, pour, par la suite, cribler des composés médicaments pour les troubles de la mémoire associés aux maladies neurodégénératives. Ces deux tests non-aversifs reposent uniquement sur l'exploration d'objets ou d'espaces par l'animal. Les mêmes souris seront utilisées pour la validation des deux tests (réduction).

Nous utiliserons 36 souris (3 groupes de 12) âgées de douze semaines, hébergées dans des cages réglementaires, à quatre par cage et comprenant de l'enrichissement environnemental (bûchette à ronger, cylindre carton et matériel de nidification (raffinement)). Le remplacement des animaux dans ce projet n'est pas possible car il consiste à évaluer le comportement d'un animal.

Test de mémoire topographique : Ce test utilise une boîte expérimentale comprenant deux compartiments de forme et d'aspect modulables par addition d'inserts. Les deux compartiments sont connectés par un couloir. Le principe du test est le

suisant : L'animal est placé pendant 5 minutes dans la boîte, mais seulement un compartiment est accessible (phase d'acquisition). L'animal est ensuite replacé dans sa cage. Après un intervalle de temps, appelé temps de rétention défini (défini par la première phase de ce projet) l'animal est replacé dans la boîte (phase de restitution) alors que les deux compartiments sont accessibles. Si l'animal se rappelle du compartiment visité lors de la phase d'acquisition, il explorera le nouveau compartiment. Le temps passé par l'animal en exploration active dans chaque compartiment est mesuré afin d'établir une mesure de la mémoire topographique.

Pour le test de reconnaissance d'objets le principe est similaire au test précédent sauf que l'animal est d'abord mis en présence de deux objets identiques pendant la phase d'acquisition, puis un des objets est remplacé avec un nouvel objet, non vu auparavant, lors de la phase de rétention. Ces deux tests évaluent deux types de mémoire bien distincts et modulés par deux zones distinctes du cerveau.

Cette validation nous permettra par la suite d'évaluer les déficits potentiels dans nos modèles murins de maladies neurodégénératives.

La première phase de ce projet consiste à établir le temps de rétention nécessaire afin qu'il produise un oubli. Les animaux seront d'abord soumis au test de reconnaissance d'objets. Trois différents temps de rétention seront testés. 24 heures après ce test les animaux seront évalués dans le test de mémoire topographique en utilisant aussi trois différents temps de rétention.

La deuxième phase, s'effectuera une semaine après la fin de la première, et utilisera les mêmes animaux (réduction). Elle consistera à valider pharmacologiquement le modèle en évaluant l'effet de la scopolamine, ayant des effets délétères transitoires sur la mémoire aussi bien chez le rongeur que chez l'homme. Les mêmes 36 souris seront injectées par voie sous-cutanée soit avec de la scopolamine à deux doses soit avec le véhicule (sérum physiologique). Les TRs utilisés dans ces expériences seront ceux les plus optimaux définis par la première phase de ce projet.

Nous débuterons cette deuxième phase avec le test de la mémoire visuelle d'objets suivi, une semaine après, du test de mémoire topographique (les animaux sont de nouveau injectés avec de la scopolamine de la même manière que dans le test de reconnaissance d'objets), afin de laisser l'animal récupérer et la scopolamine de ne plus être présente dans l'organisme.

L'étude des phénomènes de mémoire nécessite l'utilisation d'animaux non-stressés et en bonne santé. Dans le cas fortement improbable ou une altération de l'état général de l'animal, ou qu'une inflammation due à la première injection de scopolamine serait notée, l'animal sera mis à mort immédiatement. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude.

3023. Les études précliniques permettent d'acquérir les premières connaissances sur le comportement d'un candidat médicament, indispensable avant les essais chez l'Homme. Le développement préclinique fait en particulier appel à l'expérimentation animale, qui est une étape indispensable à la connaissance d'un futur médicament avant de l'administrer à l'Homme. En effet, il n'est pas envisageable d'administrer un nouveau composé à l'Homme sain ou malade compte tenu des risques non connus susceptibles d'apparaître. Au cours du développement préclinique, un grand nombre d'études sont effectuées afin de qualifier le candidat médicament sur le plan de la pharmacologie, de la pharmacocinétique ou encore de la toxicologie. Ces études sont constitutives d'une partie du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché (AMM) du futur médicament.

Dans le cadre de nos programmes de maturation internes, nous développons au stade pré-clinique des nouvelles molécules pharmaceutiques appartenant à la famille des anti-cancéreux (molécules cytotoxiques ou anti-angiogéniques) ou des anti-inflammatoires. Pour chaque nouvelle molécule intégrée dans notre pipeline, des études de toxicologie, de pharmacocinétique et d'efficacité seront entreprises. Cette demande d'éthique concerne les études de pharmacocinétique. Elles permettent de décrire le comportement et le devenir d'un composé au cours du temps dans un organisme vivant. Classiquement il s'agit de modéliser son Absorption, sa Distribution dans l'organisme, son Métabolisme, c'est à dire comment l'organisme procède à sa transformation, et enfin à son Elimination (ADME). La détermination des paramètres pharmacocinétiques d'un médicament apporte les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et d'adapter les posologies pour son utilisation future.

En fonction de nos candidat-médicaments, nous sommes amenés à réaliser ces études de pharmacocinétique chez le rat ou chez la souris. En effet, pour le développement d'une molécule pharmaceutique, il y a nécessité de montrer son effet dans des modèles animaux indépendants. Pour cette procédure, le produit à tester sera administré à 3 concentrations différentes (une faible, une intermédiaire et une forte) représentant des doses non toxiques pour l'animal. Une fois l'administration du composé effectuée, des prélèvements sanguins au cours du temps seront réalisés afin de déterminer les concentrations restantes du composé administré (prélèvement terminal, 1 animal = 1 temps). Après le prélèvement sanguin, chaque animal sera mis à mort.

Nous estimons que 4050 animaux au total seront nécessaires pour réaliser 30 études pendant une durée de 5 ans, soit 2025 souris et 2025 rats. Ceci est une estimation et repose sur l'évaluation de 6 nouvelles molécules thérapeutiques potentielles par an.

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

- « Réduire » le nombre d'animaux en expérimentation :

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire et suffisant d'animaux, pour garder une puissance statistique dans le traitement des résultats et pour avoir le nombre de contrôles internes suffisant, afin de pouvoir conclure sur la pharmacocinétique du traitement.

- « Raffiner » la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites (critères d'interruption, ou "end-points") :

Les rats ou les souris seront suivis tout au long de la procédure pour pouvoir identifier les signes éventuels de souffrance : les changements physiques (pelage, peau, yeux...), la mobilité, l'alimentation, l'agressivité, la consistance des fèces. Si les signes

persistent pendant plusieurs heures au cours de la procédure, l'animal sera mis à mort après concertation avec le référent du comité bien-être des animaux. Notons que les composés seront administrés à des concentrations dont on sait qu'ils n'induisent pas de douleur ou de détresse.

- « Remplacer » les modèles animaux :

Notre projet se focalise sur un modèle d'étude de pharmacocinétique nécessitant l'utilisation d'un modèle animal pour reproduire la physiologie d'un organisme entier. On peut considérer la pharmacocinétique comme l'étude du devenir du médicament dans l'organisme ou encore comme l'étude de l'influence de l'organisme sur le médicament. L'organisme peut en effet réagir vis-à-vis de la molécule qui lui a été administrée en limitant son absorption, en l'inactivant et en l'éliminant par voie rénale, digestive ou pulmonaire. L'utilisation d'un modèle cellulaire pour ces études n'est donc pas relevant.

3024. Avec l'âge, on observe une sarcopénie (perte de masse et de force musculaires) avec de nombreuses conséquences telles que l'augmentation du risque de chutes et de fractures. Elle représente donc un facteur de risque de dépendance important. Elle est la conséquence d'un défaut de synthèse des protéines dans le muscle âgé et en particulier d'une résistance de la synthèse des protéines à l'effet activateur d'un repas. Toutefois, la sarcopénie peut être prévenue ou corrigée. En effet, l'apport de certaines protéines qui augmentent de façon rapide et importante la vitesse d'apparition des acides aminés dans le sang est capable d'activer cette synthèse. La vitesse de digestion des protéines joue un rôle important dans cette vitesse d'apparition des acides aminés plasmatiques. Si l'on considère les deux fractions protéiques majeures du lait, les caséines et les protéines du lactosérum, les premières sont qualifiées de protéines lentes car elles précipitent dans l'estomac et ne parviennent que lentement dans l'intestin. Les secondes sont qualifiées de rapides car elles restent solubles dans l'estomac et sont donc digérées rapidement. L'intérêt de l'utilisation des protéines rapides pour améliorer la masse protéique musculaire du sujet âgé est clairement établi. Par ailleurs nous avons montré que la citrulline, un acide aminé, donnée en complément à des rats âgés dénutris, augmente significativement la synthèse protéique musculaire. Toutefois, cette activation de la synthèse protéique nécessite qu'il y ait suffisamment d'acides aminés disponibles dans le sang.

Notre hypothèse est que, chez le rat âgé, la consommation de protéines rapides associées à la citrulline permettrait une augmentation rapide de la disponibilité des acides aminés, au moment où la citrulline active la synthèse protéique. Cette association originale pourrait aider à contrer la résistance à l'anabolisme du rat âgé en améliorant la synthèse protéique musculaire et en permettant à terme d'augmenter la masse et la fonction musculaires. Le but du projet est de tester l'efficacité de cette stratégie nutritionnelle dans la prise en charge de la sarcopénie chez le rat mâle Sprague-Dawley âgé. Dans une première étude des animaux sains de 21 mois recevront par gavage différents bolus (6 groupes de 8 rats) afin d'étudier la disponibilité des acides aminés plasmatiques. Puis nous nous intéresserons à l'animal âgé ayant subi une dénutrition pour étudier l'efficacité de ces associations sur le métabolisme et la fonction musculaire. Dans ce modèle, un effectif de 12 animaux par groupe est nécessaire compte tenu de l'hétérogénéité de la dénutrition.

En conformité avec la « règle des 3R » nous avons réduit au minimum le nombre d'animaux par groupe et raffiné la méthodologie grâce notamment à un protocole de prise en charge de la douleur, l'introduction de points limites ou encore des analyses statistiques adéquates. En revanche, les études métaboliques évaluant une prise en charge nutritionnelle ne pouvant être réalisées ni in vitro ni ex vivo, ce modèle murin n'est pas remplaçable. Le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet est de 132 rats. Les résultats de cette étude permettront de mieux appréhender la prise en charge du sujet âgé dénutri.

3025. Ce projet a pour but de caractériser par Imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (IRMN) et par Spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire (SRMN) le muscle squelettique dans un nouveau modèle murin de dysferlinopathie, MMex38, et de comparer ce dernier au modèle murin de la dystrophie de Duchenne, mdx.

La dystrophie de Duchenne (DMD) est l'une des formes les plus graves et les plus courantes de myopathies chez l'Homme. En moyenne, à la naissance, un garçon sur 3500 est atteint par cette pathologie, qui est due à une mutation du gène codant pour la protéine dystrophine. La dysferlinopathie est une autre forme de myopathie, due à une mutation du gène codant pour la protéine membranaire dysferline. Ces deux protéines, la dystrophine et la dysferline, sont associées à la membrane cellulaire des muscles squelettiques. La dystrophine crée une connexion entre le cytosquelette de la cellule et le sarcolemme, la membrane de la cellule. Elle joue ainsi un rôle majeur dans l'intégrité de la membrane cellulaire. La dysferline joue un rôle important dans la réparation des membranes cellulaires, après lésions, via un mécanisme calcium indépendant, mais sa fonction exacte reste encore incertaine.

Des mutations de ces protéines, qui sont très impliquées dans le maintien de l'intégrité cellulaire des muscles squelettiques, peuvent causer de graves troubles tels que la dégénérescence primitive des tissus musculaires. Les personnes atteintes de dystrophies musculaires ont une espérance de vie réduite. Des progrès indéniables ont été faits dans les connaissances génétiques de ces maladies, mais leur expression clinique est hétérogène. Une meilleure compréhension de leurs expressions phénotypiques reste nécessaire afin de mieux comprendre leur développement et progression. Actuellement il n'existe aucun traitement pour guérir les myopathies. De nombreuses informations sont encore nécessaires afin qu'on puisse comprendre les mécanismes pathologique sous-jacents et proposer des approches thérapeutiques.

L'objectif principal de ce projet est d'utiliser la RMN du sodium ( $^{23}\text{Na}$ ) et du phosphore ( $^{31}\text{P}$ ) et les spectres de temps de relaxation du signal proton ( $^1\text{H}$ ), et de les combiner avec des méthodes d'imagerie plus conventionnelles afin d'étudier l'atteinte musculaire ainsi que les détériorations au niveau des membranes cellulaires chez des souris atteintes de différents types de dystrophies neuromusculaires. Le second objectif de ce projet est de caractériser l'impact sur le métabolisme

énergétique de la délétion de la protéine dysferline. Pour réaliser ce protocole, nous aurons besoin d'avoir recours à 132 souris en tentant compte de la règle de 3 R et afin d'attendre une significativité statistique.

La réduction du nombre d'animaux est assurée par la minimalisation de la variabilité entre les individus des groupes, pour ce qui concerne l'âge et les variations sanitaires (un seul fournisseur pour chaque lignée).

Le raffinement avant l'expérimentation sera fait par l'enrichissement de l'environnement et par l'élevage des souris en groupes, selon les portées. En plus, le projet a comme méthode principale la RMN in vivo, une méthode non invasive et atraumatique. Le remplacement des modèles animaux n'est pas encore possible pour les études dans le domaine de l'imagerie par résonance magnétique.

3026. Un nombre croissant de données indique que le comportement des gliomes (prolifération, progression, invasion) et surtout une grande partie de la résistance aux traitements, sont déterminés par une sous-population de cellules tumorales aux propriétés souches et initiatrices de tumeurs. Ces cellules sont dénommées cellules souches de gliomes ou cellules initiatrices de gliomes (GSC ou GIC). Cibler les GSC et leurs propriétés constitue ainsi l'un des principaux défis thérapeutiques. En effet, aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour. La demi-vie des patients atteints des formes les plus agressives de gliomes va de quelques mois (enfants) à 2 ans (adultes).

Nous avons identifié des petites molécules capables d'inhiber les propriétés des GSC. Ces molécules sont des produits du métabolisme 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 projet vise à élargir notre étude in vitro à l'évaluation in vivo du rôle de ces enzymes du métabolisme et de leurs produits dans le contrôle des propriétés souches des GSC mais aussi de cellules souches neurales normales, en caractérisant leurs effets in vivo à l'aide de modèles murins aussi proches que possible de la pathologie humaine. En effet, si les modèles in vitro permettent d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, seuls les modèles in vivo offrent 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 GSC 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 GSC de souris 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 tient compte de la règle des 3R. Le développement des gliomes dépend de l'interaction entre cellules tumorales, cellules normales du tissu, et des apports sanguins. Leur modélisation chez l'animal est donc irremplaçable par des approches in vitro ou ex vivo. Il tient compte aussi de l'aspect « réduction » en limitant au minimum le nombre d'animaux. Le suivi longitudinal de la croissance tumorale par bioluminescence permet notamment d'éviter le sacrifice d'animaux à des temps intermédiaires pour vérifier la cinétique de croissance tumorale et donc de limiter le nombre d'individus. 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 le principe de réduction. Les conditions d'hébergement et de soin des animaux sont optimisées pour réduire au maximum toute douleur et souffrance, grâce notamment à un suivi journalier des animaux, prenant ainsi en compte le principe de raffinement.

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 30 expériences sont prévues, soit un total de 660 souris adultes femelles. Il devrait permettre de tester le rôle de 5 enzymes distincts et d'évaluer les effets de l'administration des métabolites correspondants sur la croissance tumorale.

3027. A l'heure actuelle, aucun modèle d'expérimentation pré clinique ne permet d'explorer fidèlement les réponses immunitaires humaines. Parce que le fonctionnement du système immunitaire entre l'homme et l'animal est différent : les réponses humaines sont spécifiquement restreintes aux complexes HLAs alors que les souris expriment les complexes H2 et non HLAs. Les contraintes éthiques des essais cliniques soulèvent une nécessité urgente d'améliorer les modèles animaux pouvant mimer fidèlement les réponses humaines, en particulier les réponses du système immunitaire humain (HIS). Les souris dites « humanisées » ou « HIS » ont été récemment générées en greffant des cellules souches hématopoïétiques humaines (hHSCs) ou des cellules mononucléées du sang périphérique humain (hPBMCs) dans des souris immunodéficientes, telles que les souris NSG ou souris NOG et les souris NRG, qui sont des modèles bien validés. Cependant, un inconvénient majeur pour les études expérimentales utilisant le modèle de souris hHSC-NSG est que les réponses sont H2-restreintes et non-HLA-restreintes. Alors que dans le modèle de souris hPBMC-NSG, est l'apparition rapide, d'une maladie du greffon contre l'hôte (xénoGVHD). Nous voulons surmonter cette limitation (compatibilité HLA entre donneur/receveur) en générant une nouvelle souris "HUMAMICE" immunodéprimée et qui exprime des molécules HLA humaines à la place des molécules du CMH de souris (H-2). Humamice correspond à une version améliorée des modèles de référence actuels de souris immunodéprimées NSG ou NOG. En effet, le modèle Humamice permet au système immunitaire humain transféré dans la souris de fonctionner correctement et physiologiquement, en respectant la compatibilité HLA entre donneur et receveur. Nous attendons que le

transfert de hPBMC-HLA-compatibles dans cette souris Humamice permet de réverser son statut immunodéficient en statut immunocompétent. Ce modèle représente l'unique modèle expérimental pré-clinique, dans lequel les cellules immunitaires humaines transférées dans la souris conservent leurs propriétés et sont capables de générer des réponses immunitaires identiques à celles observées chez l'homme. En effet, le présent projet consiste à une évaluation de la capacité de ces souris HUMAMICE dans la reconstitution d'un système immunitaire humain à partir des cellules souches CD34+ injectées ou la capacité d'acceptance d'un transfert adoptif d'un système immunitaire humain complet via les cellules hPBMC transférées. La qualité du système immunitaire reconstituée ou adoptivement transférée sera examinée d'abord aux niveaux quantitatifs par une numérisation des différentes populations constituantes du système immunitaire humaine puis au niveau fonctionnalité des différentes populations cellulaire.

L'objectif est de pouvoir reproduire fidèlement in vivo les réponses immunitaires humaines dans des conditions physiologiques normales ou pathologiques et de proposer ce modèle pour d'explorer les réponses immunitaires humaine ou d'évaluer de nouvelles approches thérapeutiques. Dans ce présent projet, la fonctionnalité du système immunitaire sera évaluée en immunisant les souris hPBMC-HUMAMICE ou hCD34+-HUMAMICE avec des vaccins commerciaux contre le virus de l'hépatite B (HBV). Les réponses obtenus seront comparées aux réponses cliniques afin d'affirmer la fiabilité dans la prédiction des réponses humaines dans ce modèle.

Le projet nécessitera l'utilisation de 200 souris. La règle des 3R sera respectée pendant toute la durée du projet : le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum pour obtenir des résultats statistiquement fiables et tout sera mis en œuvre pour le raffinement de l'hébergement (enrichissement, stabulation avec les congénères) et des procédures expérimentales (anesthésie).

3028. Ce projet consiste en 2 étapes cruciales pour la mise en place d'un programme de développement d'un nouveau traitement ciblant une pathologie appelée Ataxie de Friedreich.

Dans ce projet, nous avons dans un premier temps besoin de mettre en place deux techniques d'injections, afin de pouvoir utiliser ces voies d'administration pour travailler avec les futurs traitements en développement.

Lorsque ces techniques seront validées, nous effectuerons une expérience préliminaire au projet principal et incluant deux vecteurs de traitement potentiel, afin de vérifier leurs capacités à agir selon les études préalables.

L'étude principale visant à mettre en évidence les capacités thérapeutiques des traitements fera l'objet d'une demande à part entière.

Le projet cible une classe thérapeutique appelée AAV, pour virus adéno-associés. Il s'agit d'utiliser les capacités de ces virus à s'intégrer dans les neurones et à permettre l'expression de protéines utiles pour corriger un mauvais fonctionnement de l'organisme malade.

Les AAV doivent diffuser jusqu'aux cellules d'intérêt selon les tissus visés, que cela soit au niveau périphérique (cœur et ganglions dorsaux) ou central (cerveau).

Nous devons donc nous assurer que l'AAV sera présent dans les organes à traiter afin de valider de manière convenable son activité.

Dans le cadre de ce projet, nous souhaitons donc cibler ces tissus, 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.

3029. Nous allons comparer ainsi les voies intra-thécales (i.t.), intraveineuses (i.v.) et intra-cérébroventriculaire (i.c.v.) dans cette étude, et évaluer la présence et l'activité de l'AAV dans les tissus d'intérêt.

Une première étape consistera à former le personnel technique sur les injections icv et it (l'injection iv est une compétence déjà acquise), à l'aide d'une personne pratiquant ces injections de manière routinière.

Un lot d'animaux sera dévoué à ce but. Nous utiliserons un marqueur coloré pour confirmer les injections icv ou un agent pharmacologique (NMDA) déclenchant une réponse comportementale caractéristique et permettant de réutiliser les animaux afin de satisfaire aux exigences de réduction et de raffinement exigées par les règles d'éthique en vigueur.

Si l'étape de validation ne permet pas de mettre en place la technique à l'âge de 23 jours de manière satisfaisante, nous testerons la technique sur des animaux plus âgés, jusqu'à l'âge de 5 semaines.

Par la suite, des injections utilisant les deux vecteurs seront pratiquées, par les personnes formées, et la distribution des vecteurs et leur activité sur l'expression du gène d'intérêt seront évaluées.

Nous prévoyons donc d'utiliser pour la formation, des souris sauvages C57Bl/6N âgées de 23 jours (ou plus si cela ne s'avère pas concluant) pour pratiquer les injections icv et it. Un total de 100 souris au maximum sera utilisé pour cela.

Pour l'étude utilisant les deux vecteurs, nous prévoyons d'utiliser un maximum de 80 souris, en espérant obtenir 52 souris injectées correctement. Les 28 souris additionnelles pourront être retirées ou réduites si la formation présente un taux de réussite proche de 100 % au niveau des deux techniques.

Toutes les précautions en terme d'analgésie et d'anesthésie seront prises, notamment en utilisant les protocoles actuellement mis en place et validés par le comité d'éthique au préalable, par la personne formant notre personnel.

Si l'expérience avec le vecteur n'est pas concluante, non pas pour une raison technique, liée à l'injection, mais pour un dosage de l'AAV, nous testerons une nouvelle dose de l'AAV sur une seconde expérience.

Au total, nous pourrions utiliser un maximum de 100 souris pour la validation de 2 à 3 personnes puis 2 \* 80 souris pour l'expérience pilote, soit un total de 260 souris. Toutes les démarches visant à réduire le nombre d'animaux expérimentaux et à raffiner nos techniques seront mises en place pour satisfaire aux impératifs éthiques que nous suivons.

3030. Une augmentation de l'incidence des maladies métaboliques telles que le diabète ou l'obésité est observée dans une majorité de pays. Cette augmentation résulte en partie des changements de comportements alimentaires avec notamment une consommation accrue de lipides provoquant des perturbations des fonctions métaboliques. L'équipe dans laquelle ce travail sera réalisé s'intéresse au rôle de l'intestin et à ses perturbations au cours du développement de ces pathologies. L'intestin assure plusieurs fonctions dont l'absorption des lipides et la sécrétion d'entérohormones en réponse aux nutriments. Lors des maladies métaboliques telles que l'obésité ou le diabète de type 2, les fonctions intestinales sont souvent altérées. Les acteurs impliqués dans les perturbations des fonctions intestinales sont encore mal connus et restent à définir. Comprendre les mécanismes impliqués dans ces perturbations permettrait par la suite de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques et de développer de nouvelles cibles d'interventions nutritionnelles. Des études menées par notre équipe a pu démontrer, dans un modèle cellulaire d'entérocytes humains, que SR-B1 est un détecteur de lipides alimentaires capable d'induire une cascade de signalisation intracellulaire impliquée dans l'assemblage et la sécrétion des lipoprotéines riches en triglycérides. L'équipe a également observé que SR-B1 est exprimé dans des lignées de cellules entéroendocrines murines et humaines (résultats non publiés), suggérant ainsi qu'il pourrait contribuer à la sécrétion d'entérohormones. Notre objectif est d'étudier le rôle in vivo de SR-B1 dans la détection intestinale des lipides alimentaires, dans l'homéostasie lipidique et dans la sécrétion des entérohormones. Pour cela plusieurs modèles murins d'inactivation de l'expression de SR-B1 soit dans toutes les cellules intestinales (SR-B1KOint) soit uniquement dans les cellules entéroendocrines (SR-B1 KOendo) seront comparés. Au total 160 animaux seront utilisés. La règle des 3R est prise en considération par le fait que la comparaison de ces lignées dans les mêmes expériences permet de limiter le nombre d'animaux car les mêmes souris contrôles (C57BL6 et SR-B1 flox) seront utilisées. D'autre part dans une première approche nous réaliserons une cinétique en fonction du temps après un régime lipidique ce qui permettra de définir les conditions expérimentales obtenues pour compléter ponctuellement nos expériences. Toutes les expériences seront réalisées avec du personnel expérimenté, le bien être des animaux est suivi quotidiennement, des points limites sont définis.. Ces expériences permettront de déterminer si SR-B1 peut devenir une cible thérapeutique pour le traitement de l'obésité et/ou des maladies métaboliques associées.

3031. L'objectif de notre projet est d'étudier les Dystrophies myotoniques (DM). Il s'agit de myopathies très fréquentes qui touchent 1 adulte sur 8000. Ces DM ont toutes un point commun : une anomalie de l'expression de l'ADN qui entraîne des altérations des muscles squelettiques et du cœur. Il a été mis en évidence que ces anomalies d'expression de l'ADN touchent en particulier un gène intervenant dans la structure des membranes des cellules musculaires. La compréhension de l'expression de ce gène nous permettra de mieux comprendre voire de traiter dans le futur ce type de myopathies chez l'Homme.

Pour réaliser ce projet, nous allons utiliser des souris car aucun modèle de culture cellulaire ne nous permet d'obtenir les résultats. De plus, la souris est un modèle de myopathies déjà utilisé du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Les souris utilisées recevront un traitement voisin de la thérapie génique : des virus seront injectés dans les muscles afin d'apporter directement le gène responsable de la maladie. La moitié des animaux utilisés recevra un gène normal.

Afin de limiter le stress induit par l'injection, cette dernière sera faite sous anesthésie générale. Au réveil et par la suite, aucun dommage particulier n'est attendu car le gène malade n'aura qu'un effet local sur un seul muscle. Cependant, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un anti-inflammatoire. Si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, nos précédentes études ont permis d'avoir des résultats valides avec des groupes 6 animaux. Ainsi, dans ce projet un total de 18 animaux sera utilisé lors des procédures expérimentales. De plus, un maximum d'analyses seront faites sur les muscles prélevés pour éviter un doublon de cette procédure expérimentale

3032. La manipulation d'actinides, émetteurs alpha tels que le plutonium ou l'américium, par les travailleurs de l'industrie électronucléaire engendre un risque de contamination. Des contaminations internes suite à des blessures ont été signalées depuis la généralisation de l'utilisation de ces composés dans le monde. Les actinides ne traversent pas ou faiblement la première barrière de la cornée stratifiée d'une peau saine. Toutefois, une perte d'intégrité de cette barrière par blessure mécanique, chimique ou thermique, permet l'entrée de ces composés. Le type et la localisation de la blessure ainsi que les propriétés physico-chimiques du contaminant conditionnent leur comportement dans l'organisme.

Le DTPA (acide diéthylène triamine penta acétique) est le seul traitement des actinides recommandé et disposant de l'autorisation de mise sur le marché à ce jour. L'efficacité de decorporation par le DTPA dans le cas des actinides dépend du protocole du traitement et repose sur 2 points essentiels: le délai entre la contamination par blessure et le traitement d'une part et le type d'administration du traitement (local ou systémique) d'autre part. En concertation avec les médecins impliqués dans le traitement des travailleurs contaminés par des actinides, nous allons tester chez les rongeurs différents protocoles de traitement avec le DTPA après contamination d'une plaie par plusieurs actinides seuls ou en combinaison. Nous allons expérimenter, soit une intervention médicale très rapide, soit plus longue dans le cas d'une plaie contaminée. Ces approches ont également un intérêt dans le cas des actes de malveillance.

Le présent projet permettra une amélioration de la prise en charge des personnes après contamination par blessure par des actinides. Ce projet ne peut pas être réalisé à l'aide des modèles cellulaires car les actinides sont retenus par différents organes cibles (os, foie) selon la nature du contaminant. Ce projet fait appel à 520 rongeurs, l'espèce pour laquelle le laboratoire possède déjà de nombreuses données permettant ainsi d'effectuer des comparaisons. Ce nombre a été réduit au

minimum nécessaire. Il a été déterminé en fonction des différents protocoles de traitement à tester pour les différents contaminants. Le nombre d'animaux par groupe (6) a été obtenu d'après l'analyse des données du laboratoire afin d'avoir une puissance statistique acceptable.

Tous les animaux proviennent d'élevages reconnus et sont nés et élevés en captivité. L'incision et la contamination du muscle de la patte arrière pourraient engendrer des souffrances ; un traitement antalgique (anti-inflammatoire non stéroïdien) est administré systématiquement pendant les trois premiers jours. Les animaux sont suivis quotidiennement et des protocoles d'anesthésie et d'euthanasie ont été définis et validés par l'équipe vétérinaire. Les animaux bénéficient des enrichissements dans leur cage, de support nutritionnel et de l'application des critères d'arrêt tout le long de la procédure expérimentale afin de veiller à leur bien-être.

3033. Le présent protocole s'inscrit dans un projet ayant pour objectif le développement de composés actifs pour la prévention et le traitement de l'obésité sarcopénique. Il n'a pas encore été mis au point de traitement efficace contre cette pathologie.

La sarcopénie est une pathologie qui touche principalement les personnes âgées ou en arrêt d'activité motrice ainsi que des patients atteints de maladie neuromusculaire et se caractérise par une perte accélérée de la masse et donc de la force musculaire. Chez les personnes âgées en surpoids, les cellules musculaires peuvent être infiltrées par des cellules adipeuses favorisant ainsi l'accumulation de lipides dans le muscle et la perte de fonctionnalité des muscles. On parle alors d'obésité sarcopénique.

La 20-hydroxyecdysone est une phytoecdysone (famille de stéroïdes extraits de plantes). Cette molécule semble limiter l'accumulation de la masse grasse et renforcer la masse maigre par un mécanisme partiellement décrit, impliquant probablement une limitation de la captation des acides gras dans le tissu adipeux, une augmentation de l'oxydation des acides gras dans le muscle et une stimulation de la synthèse protéique musculaire. Ces propriétés de la 20-hydroxyecdysone (appelée ici 20E ou BIO101) permettent d'envisager son utilisation, ainsi que l'utilisation d'un de ses dérivés (BIO103) en tant que médicaments susceptibles de prévenir l'établissement ou l'aggravation de l'obésité sarcopénique. Nous testerons ici l'effet de ces molécules dans un modèle murin de la maladie de Duchenne de Boulogne qui conduit à une faiblesse musculaire et à une atrophie musculaire (maladie neuromusculaire).

Nous étudierons 40 souris au total, car il n'est pas possible de réaliser cette étude sur des cellules. Leur nombre a été calculé au plus juste en fonction de l'analyse statistique. Le milieu dans lequel est élevé les souris est enrichi et toutes les mesures sont prises afin d'éviter leur souffrance.

Il n'est pas possible de mimer l'effet d'une molécule sur la morphologie des muscles au niveau cellulaire in vitro, ce qui oblige de réaliser notre étude chez l'animal entier.

Le comportement normal (toilette, repos, alimentation dans la cage, interaction avec le congénère) et anormal (déplacement incessant lors de la phase diurne, immobilité) dans la cage et l'aspect visuel de la souris est évalué tous les jours par le personnel de l'animalerie. Les animaux sont pesés chaque semaine afin d'identifier une perte de poids corporelle. En cas de perte de poids importante (> 20%) la souris est euthanasiée. Le critère de perte de poids sera complété par l'observation du comportement des animaux. Une diminution de l'activité motrice et une faiblesse d'un animal entraînera sa sortie du protocole et son euthanasie.

S'agissant de l'enrichissement, toutes les cages de cette étude seront garnies de cellulose (litière douce) avec une maisonnette en carton afin de limiter au maximum les agressions.

3034. La question de la satisfaction des besoins en acides aminés est une question majeure pour la population mondiale. En effet, l'apport protéique d'une partie de cette population, notamment en Afrique subsaharienne et en Asie, est peu diversifié et provient le plus souvent des céréales. Dans un contexte où l'apport protéique total est généralement modéré, voire bas dans ces régions, le risque de déficience en certains acides aminés indispensables est important. La lysine est concernée au premier rang, mais d'autres acides aminés peuvent être sub-limitants dans ce type de régimes.

Ce projet a pour objectif de déterminer quels sont les organes les plus sensibles à la déficience en lysine (intestin, pancréas, foie, rein, muscle, hypothalamus) et d'identifier des biomarqueurs de cette déficience.

Dans ce contexte, deux procédures expérimentales seront mises en place. La première est une étude pilote (n=12) qui a pour objectif d'évaluer l'effet de différents régimes sur la prise alimentaire. Des rats âgés de 3 semaines (de 50 g, après sevrage) seront alimentés soit avec un régime contrôle PLT (normoprotéique, contenant de la protéine de lait total comme source de protéine), soit avec un régime à base de gluten et déficient en lysine (GL35), soit avec un régime à base de gluten et supplémenté en lysine (GL100). Dans cette première procédure, nous comparerons la prise alimentaire des groupes PLT, GL35 et GL100 (n=4 par groupe). Le régime GL35 pourrait entraîner une baisse de la prise alimentaire. De même, la supplémentation en lysine pourrait réduire la consommation de l'aliment GL100 comparativement au groupe PLT. Les résultats de cette première procédure détermineront la nécessité d'ajouter ou non un groupe GL100PF (groupe GL100 dont la prise alimentaire sera calquée sur la prise alimentaire du groupe GL35) dans la seconde procédure, ce qui permettra de dissocier les effets de l'ingéré énergétique de ceux de la déficience ou supplémentation en lysine, sur les paramètres étudiés. La nécessité de mesurer les conséquences de l'ingestion de régimes à teneur variable en lysine sur le comportement alimentaire et les paramètres de la croissance (gain de poids et de masse musculaire) empêche de remplacer l'expérimentation animale par des modèles cellulaires ou moléculaires.

La seconde procédure vise à étudier la sensibilité des tissus et des organes et à rechercher des biomarqueurs en réponse à la déficience en lysine. Elle implique 96 rats de 3 semaines qui seront alimentés avec le régime contrôle PLT pendant 15 jours.

Les rats seront ensuite répartis en 4 groupes expérimentaux (n=24), recevant respectivement pendant 15 jours supplémentaires soit le régime contrôle PLT, soit le GL35, soit le GL100 ou le GL100PF. Chaque groupe expérimental sera subdivisé en 4 sous-groupes de 6 animaux en fonction des organes étudiés (foie et hypothalamus/intestin/muscle/reins et pancréas). Au cours de l'expérimentation, les animaux vivront en cages individuelles transparentes, enrichies avec des anneaux, pour le suivi de leur consommation alimentaire et de l'évolution de leur poids corporel. L'alimentation sera distribuée en deux repas: un repas calibré entre 9 et 10h et un repas au cours duquel la prise alimentaire n'est pas contrôlée sauf pour le groupe GL100PF. Au jour 13 et au jour 28, suite à l'ingestion d'un repas calibré, des prises de sang seront réalisées dans la veine caudale lors d'une cinétique post-prandiale, (à jeun, 30, 60, 120 et 240 min). A 18h, les animaux seront placés en cage métabolique pendant 48 heures afin de collecter les urines et les fèces et mesurer la digestibilité des protéines alimentaires des différents régimes par mesure de l'azote dans les fèces. A la fin de l'expérimentation, les animaux seront euthanasiés et la composition corporelle sera étudiée.

Cette étude permettra de définir les organes les plus sensibles à la déficience d'apport en lysine et les biomarqueurs associés. Les objectifs du projet ne peuvent donc être atteints sans recours à un animal, considéré comme modèle pour l'Homme, en particulier pour des analyses sur des organes et tissus.

3035. Le carcinome hépatocellulaire (CHC), troisième cause de mortalité par cancer dans le monde, représente un problème majeur de santé publique pour lequel les options thérapeutiques sont limitées : bien que les tumeurs à un stade précoce puissent être traitées de façon curative en utilisant des approches chirurgicales, elles sont souvent diagnostiquées à un stade avancé, où les patients ne peuvent bénéficier que d'une option palliative. Ainsi, une thérapie qui soit bien tolérée, peu coûteuse et qui présente un ratio bénéfice-risque acceptable fait défaut.

Le présent projet concerne le développement de nanovecteurs (particules d'une taille inférieure à 100 nm, soit 0,1 millièmètre) comme outils diagnostiques et thérapeutiques pour le traitement du carcinome hépatocellulaire. Les objectifs de ce projet portent sur une meilleure compréhension de la pathogenèse du CHC, la découverte de nouvelles cibles moléculaires, le développement de modèles animaux plus adaptés pour l'étude du CHC et l'évaluation préclinique d'approches thérapeutiques.

Notre projet comprend cinq modules de travail fortement interconnectés allant d'études in vitro sur l'origine de ce cancer jusqu'à la formation des chirurgiens, en passant par l'optimisation de la stratégie diagnostique et thérapeutique chez l'Homme après mise en place sur des modèles animaux, objets de la présente demande.

Ce projet sera réalisé par un consortium regroupant cinq équipes de recherche fondamentale, des partenaires cliniques et industriels ainsi que, pour le développement et la caractérisation de modèles animaux, un Institut spécialisé dans le développement et l'utilisation de modèles animaux sur souris. Trois modèles murins (souris : deux, rat : un) et deux modèles porcins de CHC seront mis en place sur trois sites différents qui soumettront chacun une demande d'autorisation à leur propre comité d'éthique, pour les modèles qui les concernent.

Deux modèles de CHC humanisé chez la souris font l'objet de cette demande. Ils sont basés sur la greffe de cellules tumorales humaines modifiées pour l'utilisation chez la souris de laboratoire ou de tumeurs primaires issues de patients ayant subi une intervention chirurgicale sur leur tumeur.

Les nanovecteurs candidats étant des produits innovants par rapport à ceux qui existent déjà, les résultats de la littérature ne permettent pas de prédire leur comportement in vivo et de s'affranchir d'une étape d'expérimentation animale. L'expérimentation animale sur petit, puis sur gros animal, est nécessaire pour évaluer le comportement de ces vecteurs, notamment leur répartition dans l'organisme, ainsi que leur éventuelle toxicité et leur efficacité sur une tumeur vascularisée, impossible à reproduire in vitro. Plusieurs nanovecteurs candidats seront tout d'abord testés in vitro, seuls ceux ayant répondu aux critères in vitro de non-toxicité et d'efficacité seront évalués par la suite in vivo. En effet, la sélection des nanovecteurs candidats se fera progressivement, tout d'abord lors de l'expérimentation in vitro, puis lors de l'expérimentation sur rongeurs avant de passer sur le cochon, chez lequel un ou deux candidats au maximum seront testés : cette méthodologie permet de réduire et remplacer au mieux l'utilisation d'animaux. Ainsi, pour ce projet, 2210 souris seront utilisées.

De plus, afin de raffiner au mieux les expérimentations, les animaux porteurs de tumeurs auront un suivi quotidien adapté afin d'éviter toute souffrance liée au développement du cancer (antalgie systématique) et tous les moyens nécessaires seront mis en œuvre pour éviter tout stress ou douleurs lors des procédures (anesthésie, imagerie non invasive).

La présente demande concerne le développement et l'utilisation des modèles Souris uniquement. Les modèles rats et cochons feront l'objet de demandes distinctes.

3036. La dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) est la première cause de malvoyance chez les personnes de plus de 50 ans dans les pays industrialisés et la troisième cause dans le monde. Sa fréquence augmente avec l'âge et son incidence augmentera compte tenu de l'allongement de l'espérance de vie. Cette pathologie oculaire touche la macula, zone de la rétine impliquée dans la vision centrale et de précision. La maladie est silencieuse pendant plusieurs années, puis la vision et la perception des détails baissent, des taches sombres apparaissent au centre du champ de la vision. L'environnement et la prédisposition génétique sont des facteurs de risque de la maladie: le risque de développer une DMLA est quatre fois plus important si un parent ou un membre de la fratrie est atteint d'une susceptibilité génétique. Plusieurs gènes associés à la maladie ont été mis en évidence.

L'objectif de ce projet est d'utiliser dans l'établissement utilisateur, un modèle animal porteur d'un défaut d'un gène associé à la maladie. Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'œil et l'absence pour l'instant de modèle



alternatif, nous devons avoir recours à ces animaux. Leur utilisation permettra d'identifier les substances thérapeutiques et d'en définir les doses efficaces.

Ce projet sera mené chez le rat. Ce projet nécessitera sur 5 ans au maximum 1600 animaux âgés de 5 à 9 semaines en début d'étude. Les informations bibliographiques, les analyses statistiques et notre expérience, nous permettront de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des rongeurs sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum sont appliqués. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages de taille adaptée, un enrichissement est fourni pour améliorer le bien être de l'animal. Ce projet a été soumis et évalué par un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

3037. L'aluminium se retrouve dans nos assiettes en tant qu'additif alimentaire. Il est utilisé pour améliorer la conservation, la texture, mais aussi la couleur des produits. Les produits aluminiques sont diversement utilisés notamment pour le traitement de l'eau, la fabrication d'additifs alimentaires et de colorants ou encore de produits pharmaceutiques, mais également de cosmétiques, d'ustensiles et matériaux d'emballage de produits alimentaires. La principale voie d'exposition à l'aluminium pour la population est l'alimentation. Dès 2003, l'InVS, l'Institut de veille sanitaire, publiait un rapport spécifiant que " de nombreuses études montrent que l'aluminium peut être toxique pour les plantes, les animaux et l'homme ". Après absorption, l'aluminium se répartit dans les tissus chez les animaux et chez l'homme et s'accumule dans certains d'entre eux, en particulier dans les os. L'aluminium peut l'expérimentation sur rats dans un modèle reconnu d'hypersensibilité viscérale, ne nécessitant pas de chirurgie. Uniquement pour l'étude des mécanismes, des souris transgéniques doivent être utilisées: le même modèle adapté à la souris, plus contraignant car nécessitant un acte chirurgical chez la souris, doit alors être mis en place. Des effectifs de 15 souris ou 10 rats par groupe sont nécessaires et suffisants pour l'obtention de données significatives. Un total de 100 rats et 140 souris sont nécessaires. Pour réduire au minimum le nombre d'animaux: Les expérimentations seront effectuées sur un nombre de 5 rats ou souris dans un premier temps, et seront renouvelées pour atteindre le seuil de significativité uniquement si cela est nécessaire et uniquement si les données préliminaires sont encourageantes.

Pour réduire la douleur: la durée et l'intensité de la douleur engendrée par les distensions colorectales sont standardisées au niveau le plus bas permettant d'obtenir des données fiables et suffisamment homogènes malgré la variabilité inter-individuelle. Pour réduire l'angoisse: les procédures classiques seront appliquées: pas de bruit inutile et stressant, phase d'acclimatation pour tout changement d'environnement, enrichissement, application des procédures pour le nombre de rongeur par cage.

Etude statistique: Les analyses statistiques seront effectuées via le test Mann Whitney qui est adapté au nombre d'échantillons faible

L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle de l'ingestion d'aluminium dans la douleur viscérale. Aucun modèle in vitro ne permet d'évaluer un processus aussi complexe que la sensibilité viscérale. Ce projet nécessite

3038. L'hépatocarcinome (HCC) est un cancer primitif du foie, 8e dans le monde par ordre de fréquence et premier des cancers primitifs du foie. L'incidence annuelle mondiale est d'environ 500 000 nouveaux cas par an. Dans les pays développés, son incidence a particulièrement augmenté ces vingt dernières années en raison de l'augmentation de l'incidence de la cirrhose due au virus de l'hépatite B ou de l'hépatite C.

Les traitements palliatifs du HCC sont la chimio-embolisation intra-artérielle (administration d'une chimiothérapie) ou la radio-embolisation intra-artérielle (administration d'une radiothérapie), directement au sein de la tumeur, couplée à l'obturation des artères nourricières de cette dernière. Ces traitements sont rendus possibles par l'utilisation de Lipiodol®. Il permet la visualisation, localisation et vectorisation de l'agent de traitement de la tumeur au cours de la chimio-embolisation ou de la radio-embolisation. La nature huileuse du Lipiodol® est responsable de la formation d'une émulsion lorsqu'il est mélangé à un agent de traitement. Les traitements peuvent varier selon la nature et la dose de l'agent de traitement, le protocole d'injection, le nombre et le rythme des cures, etc...

Il apparaît nécessaire de mener des études afin de caractériser les différents traitements, d'étudier le comportement in vivo de ces différentes émulsions afin d'apporter des éléments scientifiques aux cliniciens dans leur pratique et de mettre au point de nouvelles solutions techniques pour optimiser le traitement du carcinome hépatocellulaire.

Différents modèles animaux existent et sont reconnus dans la pathologie du cancer hépatique. Le modèle rat N1S1 et le modèle lapin VX2 (modèles d'hépatocarcinome) permettent d'étudier l'injection d'émulsions à base de Lipiodol®, au plus proche de la tumeur hépatique via l'artère hépatique, tel que ces traitements sont pratiqués en clinique.

Les procédures expérimentales mises en oeuvre seront réalisées sous anesthésie et analgésie, gazeuse ou chimique. Les résultats acquis chez un même animal permettront de répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, biodistribution, imagerie) afin de raffiner le nombre total d'animaux. Selon la réglementation, nous assurons également un suivi quotidien des animaux permettant d'anticiper l'atteinte d'un point limite et nous avons mis en place un hébergement enrichi selon les normes de la réglementation.

Le projet nécessite l'utilisation de 700 à 4800 rats sur 5 ans et de 270 à 1350 lapins sur 5 ans.

3039. Le cancer du poumon est la première cause de décès par cancer, en France et dans le monde (avec 20 % des décès liés aux cancers en France). Malgré les avancées récentes de la recherche, le taux de réponse des patients atteints de cancers du poumon aux traitements reste faible avec un taux de survie à 5 ans proche de 5%.

Les métastases pulmonaires ou cancers secondaires du poumon apparaissent lorsqu'un cancer qui a pris naissance ailleurs dans l'organisme se propage aux poumons. Les métastases sont des tumeurs secondaires qui peuvent se développer dans un autre organe à partir de cellules cancéreuses issues de la tumeur primitive. Elles se disséminent (c'est-à-dire se répandent) le plus souvent par la circulation sanguine. Elles se diffusent aussi par le système lymphatique mais de façon moins importante. Tout cancer peut être à l'origine d'une localisation secondaire au niveau des poumons. Cependant certains cancers primitifs ont une propension plus élevée que d'autres à métastaser dans les poumons. Il s'agit des cancers du sein, du côlon, de la prostate, du pancréas, du rein, de la thyroïde, de l'estomac, des mélanomes, de l'ovaire, des sarcomes.

Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques (chimiothérapie associée ou non à une radiothérapie) dans des modèles expérimentaux de tumeurs pulmonaires primitives ou de métastases pulmonaires induites par l'injection intraveineuse de cellules tumorales chez les rongeurs (souris/rat). Les cellules tumorales inoculées par voie intraveineuse (veine caudale) vont coloniser le poumon et former des tumeurs.

Un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale peut être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence in vivo.

La durée totale de suivi dépend de la cinétique de croissance tumorale in vivo des cellules implantées ainsi que de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur (de quelques jours à plusieurs semaines selon le type et l'origine des cellules tumorales implantées). En fin d'expérience, les poumons peuvent être prélevés pour analyses. D'autres prélèvements de tissus ou de sang pourront être effectués en phase terminale.

Au cours de chaque étude de ce projet, différents groupes d'animaux seront constitués (en général 4 groupes avec 10 animaux par groupe). Pour ce projet d'une durée de 5 ans, il est prévu un nombre maximum de 1200 souris (4 groupes de 10 souris par étude x 6 études par an x 5 ans) et 400 rats (4 groupes de 10 rats par étude x 2 études par an x 5 ans).

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur (souris ou rat) car il n'existe pas de méthode alternative (in vitro ou in silico) permettant de se substituer complètement aux essais in vivo pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique sur les tumeurs pulmonaires primitives ou les métastases pulmonaires. Avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité ou de la toxicité d'un candidat médicament. À ce jour, les rongeurs (souris ou rat) sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est effectué par :

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures peu invasives et peu douloureuses lors du suivi tumoral par imagerie
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire
- l'utilisation de techniques d'analyses et de dosage adaptées nécessitant le moins de volume sanguin possible lors des prélèvements.

3040. La mitochondrie est un réseau tubulaire dynamique ayant un rôle essentiel dans la production d'énergie. Le mouvement et la répartition des mitochondries nommés "dynamique mitochondriale" permet à la cellule de s'adapter à son environnement. Il correspond à un équilibre entre le niveau de fusion et de fission des mitochondries et est médié par des protéines impliquées soit dans la fission (FIS1 et DRP1), soit dans la fusion (MFN1, MFN2 et OPA1).

De part ses fonctions et sa dynamique, la mitochondrie est située au centre du développement des stratégies de cardioprotection visant à prévenir les lésions de reperfusion suite à un infarctus du myocarde (IDM). Des études réalisées par différentes équipes ont montré que l'ischémie entraînait une fission mitochondriale dont l'inhibition pouvait avoir un rôle protecteur. Au sein de notre laboratoire, nous nous intéressons à la cardioprotection à la phase aigüe de l'IDM. La mitochondrie est un acteur majeur de ces mécanismes de cardioprotection. Dans ce cadre nous voulons étudier sur un modèle murin partiellement déficient (souris Drp1+/-) ou non (souris Drp1+/+) en protéine de fission DRP1 si des variations de la dynamique cardiaque peuvent expliquer en partie les mécanismes protecteurs de ces procédures.

L'expérimentation animale est indispensable pour étudier la dynamique mitochondriale du fait de son aspect dynamique justement. Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Les prélèvements d'organes seront optimisés afin de ne pas augmenter le nombre d'animaux nécessaires. Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie dans les suites opératoires.

Les animaux utilisés seront des souris DRP1+/- et DRP+/, le nombre d'animaux requis pour ce projet est de 144.

3041. Le présent projet a pour cadre l'évaluation pharmacologique anti-inflammatoire d'un composé s'opposant à la signalisation cellulaire, facteur déterminant dans les maladies inflammatoires de l'intestin telles que la rectocolite hémorragique ou la maladie de Crohn.

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

On prévoit un maximum de 2800 souris pour la durée totale du projet.

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

L'objectif de ce projet étant de caractériser les effets pharmacologiques d'un produit à tester sur l'intestin, organe complexe constitué de multiples types cellulaires et soumis à des variations quotidiennes d'environnement imposées notamment par l'alimentation, il n'est pas possible de limiter les études à des études strictement in vitro. La souris est un modèle de référence reconnu par la communauté scientifique et largement décrit dans la littérature.

Un petit nombre d'animaux supplémentaires étant prévu pour remplacer ceux dont le statut sanitaire ne serait pas conforme aux critères d'inclusion, ils pourront à la fin de la procédure expérimentale, être inclus dans une procédure d'entraînement ou de formation du personnel également décrite dans ce projet ou dans notre projet relatif à la formation (Acquisition et validation des compétences des personnels appliquant des procédures expérimentales chez le rongeur (rat et souris) (Projet LS-010).) Tous les animaux inclus dans les procédures n°1 et n°2 pourront être préalablement équipés d'une puce électronique (transpondeur - procédure n°3). Enfin, chaque fois que cela est possible, les animaux euthanasiés seront également utilisés pour produire des matrices biologiques indispensables aux activités de bioanalyse.

3042. Les troubles du développement sexuel (Disorders/Differences of Sexual Development ou DSD) sont des affections dont l'incidence est estimée à 1 sur 4500 enfants à la naissance. Ils sont à l'origine de pathologies variées qui regroupent l'intersexualité avec l'incertitude initiale du sexe du bébé à sa naissance, l'insuffisance hormonale, l'infertilité et les cancers ovariens et testiculaires. Comprendre le développement normal et pathologique de la gonade (futur ovaire ou testicule) est donc un enjeu majeur avec des retombées sur les diagnostics d'assignation de genre et de recours à la chirurgie (gonadectomie) et le conseil génétique aux familles d'enfants DSD.

Les DSD se mettent en place pendant le développement embryonnaire, lors de la détermination du sexe qui permet à la gonade bipotentielle de devenir un ovaire (individus XX) ou un testicule (individus XY). Pour mieux comprendre les DSD, il est important d'identifier les gènes contrôlant la détermination du sexe. Récemment, la description de mutations génétiques aboutissant à la masculinisation de patients humains XX a permis de montrer que le gène CTNNB1 est essentiel à la formation de l'ovaire. Ce projet propose d'étudier comment fonctionne ce gène dans le développement de l'ovaire.

Les techniques de culture cellulaire ne permettent pas d'appréhender le développement gonadique qui nécessite vascularisation et contexte tridimensionnel. Pour cette raison, le recours à l'expérimentation animale est essentiel pour l'étiologie des DSD. L'ovaire est constitué de plusieurs types cellulaires ayant des fonctions différentes. Pour définir le rôle de Ctnnb1 dans chaque type cellulaire de la gonade, nous utiliserons une technique permettant "d'éteindre" ce gène en ciblant un type de cellules et à un moment choisi du développement, par injection de tamoxifène, ce qui n'engendre pas d'effets secondaires. Nous étudierons trois lignées de souris dans lesquelles l'inactivation du gène Ctnnb1 est déclenchée soit dans les cellules germinales ("ovules"), soit dans les cellules somatiques (soutien architectural et synthèse d'hormones), soit dans la gonade entière. Nous étudierons les anomalies induites par l'ablation de Ctnnb1 en comparant les gonades d'embryons mutés avec celles d'embryons contrôles. Nous n'anticipons pas de phénotype dommageable pour les embryons mutés (inversion de sexe dans le cas le plus extrême). Pour réaliser ce projet, nous utiliserons 600 souris (correspondant à 24 mâles reproducteurs, 144 femelles gestantes et 432 embryons de stade de développement postérieur au 2ème tiers de la gestation). Pour réduire le nombre de souris utilisées, nous regrouperons nos analyses sur les échantillons collectés. Dès que nous atteindrons le nombre suffisant d'échantillons pour conclure de manière significative, nous arrêterons nos expérimentations. Les animaux seront hébergés par deux ou par trois dans des cages comportant des objets à ronger et des igloos pour se faire un nid de façon à garantir leur bien-être et leur permettre d'exercer les activités spécifiques à leur espèce.

Mieux comprendre les DSD est crucial car dans la plupart des cas, les cliniciens ne peuvent proposer de diagnostic, un prérequis pour envisager un suivi thérapeutique des patients tout au long de leur vie.

3043. Les traumatismes de la cornée sont un problème de santé majeur dans le monde et un des principaux motifs de consultation aux urgences ophtalmiques. Les opacités cornéennes sont la quatrième cause de cécité dans le monde. La cornée est le tissu transparent en avant de l'œil finement structuré en trois couches (nommées épithélium, stroma et endothélium) qui en garantissent la transparence, élément crucial pour notre vision. La transparence de la cornée est altérée lors d'une lésion qui peut avoir des origines multiples: infections, traumatismes physique ou chimique, greffes de cornée, complications de chirurgie réfractive au laser pour corriger les défauts de la vision (myopie, hypermétropie, astigmatisme...) ou dystrophies cornéennes (maladies héréditaires entraînant des malformations de la cornée). L'atteinte des différentes couches de la cornée peut aboutir à des réactions cicatricielles entraînant des opacités cornéennes permanentes. Malheureusement peu de traitements sont efficaces pour améliorer la cicatrisation en luttant contre l'apparition de la fibrose.

L'objectif de ce projet est la mise en place dans l'établissement utilisateur, d'un modèle de cicatrisation cornéenne consécutif à une lésion de la cornée chez le lapin et le rat. Ce modèle contribuera à participer au développement de substances thérapeutiques qui amélioreront la cicatrisation en luttant contre l'apparition de la fibrose et des opacités.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné, nous devrons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle. Bien que des laboratoires travaillent sur le développement de modèles de tissu in vitro, il n'existe pas de modèle de cornée reconstituée complète permettant d'observer la cicatrisation.

Le lapin et le rat sont des animaux largement utilisés dans la recherche en ophtalmologie pour la compréhension des mécanismes impliqués, et pour tester l'efficacité de traitements.

Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques, notre expérience, nous permettrons de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Pour ce projet, un maximum 3650 lapins et 3650 rats sur 5 ans, mâles ou femelles, sera inclus dans les études. Les animaux sont âgés de 10 à 12 semaines pour les lapins et 5 à 7 semaines pour les rats à l'arrivée dans notre animalerie. L'induction se pratiquera sur un seul œil sous anesthésie générale et locale après administration d'un antalgique.

L'aménagement de l'animalerie, les conditions d'hébergement, le bien être des animaux et leur amélioration, font l'objet d'une surveillance constante au sein de notre Société. Ce projet a été soumis au comité d'éthique et sera suivi par la structure de bien-être animal de l'établissement.

3044. L'hyperactivité vésicale est une entité complexe redéfinie par l'International Continence Society en 2002 comme un syndrome clinique nécessitant au moins l'existence d'une urgenterie, associée ou non à une incontinence et généralement associée à des contractions involontaires du détrusor.

L'hyperactivité détrusorienne est définie par la survenue de contractions du détrusor non inhibées pendant la phase de remplissage, de façon spontanée ou provoquée.

Il existe 3 types d'hyperactivité détrusorienne: neurogène, non-neurogène et idiopathique selon qu'elle soit d'origine neurologique, urologique ou inconnue respectivement

Chez les blessés médullaires, les troubles urinaires observés sont quasi constants. Ils nécessitent toujours un bilan et une prise en charge adaptée en raison des complications uro-néphrologiques, engageant le pronostic vital.

Après la phase de choc spinal (absence de reflexe mictionnel) où la vessie est flasque et acontractile, le tableau clinique et urodynamique dépend du niveau lésionnel.

Les lésions médullaires situées au-dessous de T10 sont caractérisées par l'association d'une hyperactivité détrusorienne et d'une dyssynergie vésico-sphinctérienne. Cette situation favorise la survenue de fuites d'urine et l'apparition d'un résidu post-mictionnel conduisant à des mictions reflexes fractionnées avec régime de pression élevé soutenu pouvant induire des complications sévères.

Jusqu'en 1970, les complications génito-urinaires sont au premier plan des causes de décès chez le paraplégique. Les infections sont le problème le plus fréquent chez le blessé médullaire (infections symptomatiques à répétitions). L'enjeu de la prise en charge de ces malades est d'assurer la continence, permettre le stockage à basse pression et la vidange à des pressions du détrusor faible, prévenir le retentissement des hautes pressions vésicales sur le haut appareil urinaire (insuffisance rénale), prévenir les infections récurrentes des voies urinaires.

3045. L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle permettant d'enregistrer les contractions vésicales chez le rat éveillé avec une lésion médullaire afin de tester des candidats médicaments pouvant inhiber les contractions vésicales instables apparaissant lors de la phase de remplissage. Actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant l'étude de ces instabilités vésicales suite à une lésion médullaire dans son ensemble n'existent pas, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter ces pathologies.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE. Les animaux après la chirurgie seront placés pendant 14 jours en cage individuelle afin de prévenir des mutilations, de leur assurer une bonne prise alimentaire et hydrique. Pendant cette période, les animaux recevront une administration intramusculaire de gentamycine ou autre antibiotique de remplacement et une vidange mécanique de la vessie ainsi qu'un nettoyage sera réalisé.

Les trois semaines suivantes, les animaux seront hébergés deux par cage avec la présence d'un aspen brick (enrichissement en tremble).

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 10 rats pour la mise en place de ce projet et de 900 pour tester les candidats médicaments (18 animaux par groupe pour en obtenir 12).

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

3046. L'anévrisme est une dilatation permanente d'un vaisseau dont l'évolution est la rupture : ce faisant, il provoque des hémorragies souvent dramatiques. Il existe trois techniques chirurgicales pour traiter les anévrismes :

- la chirurgie conventionnelle qui nécessite d'ouvrir le malade pour accéder à la lésion,

- la chirurgie endovasculaire – c'est-à-dire par l'intérieur du vaisseau- qui permet soit de poser une prothèse dans l'artère et ainsi d'exclure l'anévrisme ou de remplir directement la poche anévrismale de matériel (coils) pour boucher définitivement la lésion

- la chirurgie hybride qui associe les deux chirurgies précédentes.

Quelle que soit la chirurgie, des complications graves, dues aux modifications de perfusion de différents organes, peuvent survenir après l'intervention :

- paraplégie,

- l'insuffisance rénale

- l'ischémie digestive (défaut de vascularisation de portions intestinales),

- le décès suite aux lésions sur plusieurs organes.

La solution endovasculaire est moins invasive que la chirurgie ouverte et de nombreuses endoprothèses sont en voie de développement. Une des techniques proposées consiste à remplir l'anévrisme de filaments (coils) de platine pour le boucher complètement : l'anévrisme ne pourra pas saigner car le sang ne pourra plus y circuler. Du fait de leur structure métallique, ils restent en place et gardent leur volume initial.

L'objectif de notre projet est de proposer une formation destinée aux chirurgiens appliquant ces techniques endovasculaires de traitement des anévrismes par coils. L'abord sera fait, comme en chirurgie humaine, par l'artère fémorale.

La fréquence des formations serait de sept sessions annuelles au maximum avec un animal par session soit 35 animaux au plus utilisés pour ce projet.

Remplacement : Nous n'avons pas encore à disposition un modèle ex vivo satisfaisant. Il est aujourd'hui inacceptable que des chirurgiens se forment à leurs techniques sur leurs malades. Ces formations utiliseraient comme modèle animal le cochon dont les caractéristiques de poids et de taille seront choisies pour être analogues à l'Homme. Ainsi, les stagiaires seront dans les conditions opératoires les plus proches possibles du bloc hospitalier. Une présentation préalable de la technique sera faite avec un support vidéo.

Réduction : Un seul animal sera utilisé par séance. Les artères accessibles sur cet animal nous permettront plusieurs approches. Deux stagiaires, trois maximum, seront formés par session.

Raffinement : L'hébergement respecte les conditions réglementaires inhérentes à l'espèce, les manipulateurs éviteront tout stress : l'animal sera tranquilisé en case de mise à jeun (pour éviter le stress du déplacement), par injection intramusculaire qui préparera l'anesthésie consécutive. Les animaux seront hébergés sur copeaux de bois avec de l'eau à disposition.

3047. En raison de l'utilisation croissante de nanomatériaux tels que les nanotubes de carbone dans les procédés industriels, le nombre des salariés pouvant être exposés augmente sans que pour autant les propriétés toxicologiques de ces substances soient parfaitement connues.

Comme ces nanomatériaux peuvent se retrouver en suspension dans l'air, la voie majeure d'exposition professionnelle est l'inhalation et les premiers tissus exposés sont ceux de l'appareil respiratoire. Une fois déposés dans le poumon, ces nanomatériaux peuvent induire des modifications physio-pathologiques mais aussi rejoindre la circulation sanguine et se distribuer dans l'organisme.

L'évaluation du danger que représentent de tels nanomatériaux nécessite de réaliser des études de toxicologie expérimentale par inhalation chez le rat de laboratoire qui constitue un modèle de choix pour l'extrapolation des résultats à l'homme. Des rats de laboratoire seront ainsi exposés par voie oro-nasale, 6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines à des aérosols de nanotubes de carbone. Les effets toxicologiques pulmonaires et systémiques d'une telle exposition seront suivis jusqu'à 180 jours après la fin des expositions. Cette approche expérimentale nécessite, pendant les périodes d'exposition, la mise en contention des animaux dans des tubes prévus à cet effet. En raison de cette contrainte, le bien-être des animaux sera assuré avec le suivi de l'atteinte des point limites comprenant une perte de 20% du poids corporel au cours des procédures, l'apparition de signes de souffrance (prostration, piloérection, plaies), de lésions cutanées ou de tumeurs.

Lors de la rédaction de ce projet, la règle des 3R a été prise en compte. Le principe de Remplacement est cependant difficilement applicable ici car la compréhension des effets pulmonaires, et systémiques des nanotubes de carbone chez l'animal de laboratoire et chez l'homme est encore parcellaire et les études chez l'animal de laboratoire ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des cultures de cellules en raison de la complexité des mécanismes physiologiques mis en œuvre. Le principe de Réduction est mis en œuvre dans le cadre du choix des nanotubes de carbone testés. En effet cette sélection est réalisée après l'évaluation de travaux préliminaires par instillation intratrachéale réalisés par un autre laboratoire européen sur une trentaine de nanotubes de carbone, une approche permettant d'étudier la toxicité pulmonaire de nanomatériaux mais qui contrairement à l'inhalation contourne les voies aériennes supérieures. Ainsi seuls les nanotubes les plus pertinents seront testés dans cette étude. Cette collaboration européenne permettra de comparer les résultats obtenus selon les deux approches et de déterminer si l'instillation intratrachéale peut être une alternative acceptable à l'inhalation.

Le principe de Raffinement est mis en œuvre en limitant au maximum le stress des animaux à la contention pour les études par voie oro-nasale par exemple en habituant les animaux à la contention.

Un total de 528 rats femelles de 12-14 semaines sera nécessaire à l'ensemble du projet pour étudier la toxicité de six aérosols de nanotubes de carbone.

3048. Nous nous intéressons au traitement de l'information sensorielle dans le système nerveux central, et plus particulièrement au traitement de l'information tactile. Spécifiquement, nous utilisons comme modèle le système des vibrisses (« moustaches ») chez le rat. En effet, afin de parcourir leur environnement, notamment les espaces souterrains qu'ils habitent, ces animaux nocturnes utilisent majoritairement leurs vibrisses qui leur permettent de sentir les parois et repérer des obstacles éventuels sur leur parcours. Dans le système nerveux central de ce rongeur, les relais cérébraux successifs de traitement de l'information vibrissale sont caractérisés par la présence de structures anatomiques distinctes correspondant aux vibrisses du museau de l'animal et organisées selon le même arrangement en rangées et colonnes que les vibrisses sur le museau. Ce système tactile est considéré comme un très bon modèle expérimental pour l'étude du système tactile humain, et a donné lieu à de nombreuses études documentées. Il nous permet donc d'étudier les mécanismes fondamentaux de la perception sensorielle chez les mammifères.

Dans ce projet, nous nous intéressons particulièrement à l'intégration multivibrissale dans les différents relais cérébraux, c'est-à-dire aux processus qui permettent à l'animal d'adapter son comportement en fonction des caractéristiques de stimuli distribués sur plusieurs vibrisses en même temps.

L'objectif général du projet est donc d'enregistrer les réponses neuronales dans ces différentes structures pendant la présentation de stimuli complexes sur les vibrisses. Afin de contrôler précisément les stimulations, nous travaillerons sur des rats anesthésiés dont 24 vibrisses d'un côté du museau auront été insérées dans des micromanipulateurs individuels et indépendants. Nous appliquerons des mouvements sur les 24 vibrisses selon des motifs spatio-temporels mimant les mouvements induits par des contacts avec différents objets ou par un mouvement de balayage des vibrisses sur des parois.

A terme, ces recherches nous permettront de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et de réseaux du codage sensoriel tactile.

Nous prévoyons l'utilisation de 250 rats Wistar sur 5 ans. L'utilisation majoritaire de multi-électrodes nous permettra d'enregistrer un grand nombre de cellules à la fois sur chaque animal et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Les expériences auront lieu sur des animaux anesthésiés tout au long des procédures et surveillés en continu. En plus de l'anesthésie, nous appliquerons préventivement des analgésiques locaux afin d'éviter toute souffrance possible de l'animal.

3049. Dans le cadre de nos travaux de recherche en virologie, nous avons régulièrement besoin d'anticorps pour détecter des virus, protéines, peptides.

Le lapin est un bon modèle animal pour produire des anticorps de par sa facilité d'élevage et son volume sanguin.

Ce protocole a donc pour but d'immuniser des lapins en vue de leur faire produire des anticorps spécifique de virus, protéines, ou peptides d'intérêt.

Sur une durée de 5 ans, nous estimons avoir besoin de produire des anticorps chez le lapin contre 10 virus, protéines, ou peptides d'intérêt. Pour chaque molécule d'intérêt, nous immuniserons 3 lapins. Nous anticipons donc un besoin de 30 lapins sur 5 ans.

Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse 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 lapins) sans restriction ;
- Manipulation des lapins dans des box isolés prévus à cet effet par du personnel qualifié (pour limiter le stress) ;
- Mise en place d'un suivi clinique rapproché par le vétérinaire responsable de l'essai (deux fois par semaine) ;
- Anesthésie avant euthanasie (nécessaire de par le grand volume de sang que nous devons prélever en fin de protocole).

3050. Dans le cerveau humain, le néocortex est la structure cérébrale la plus développée. Les études tendent à prouver qu'il permet, entre autre, les formidables capacités d'adaptation, d'apprentissage, et de mémorisation des Mammifères. Il a été suggéré depuis de nombreuses années que la plasticité (adaptation) néocorticale repose sur des changements subtils de l'activité des réseaux neuronaux, probablement par une réorganisation du nombre et de la force des connections entre les neurones (synapses). Aucune expérience n'a réellement mis en évidence une telle réorganisation au sein du cortex préfrontal, le siège des fonctions cognitives supérieures. Pourtant, les techniques les plus modernes d'imagerie multi photonique et d'enregistrements électrophysiologiques nous permettent aujourd'hui de mesurer la structure et l'activité des réseaux neuronaux de façon non invasive sur l'animal éveillé.

Pour étudier cette plasticité synaptique dans les réseaux neuronaux en fonctionnement, nous avons choisi d'utiliser le modèle comportemental de la peur conditionnée chez la souris. Tout événement émotionnel laisse des traces neuronales qui pourront être réactivées ultérieurement. La peur est une réaction innée face au danger qui se manifeste dans des circonstances et d'une façon propres à chaque espèce. Par exemple lorsqu'un rongeur rencontre un prédateur, sa réponse de peur associe immobilisation (freezing), hypervigilance, hypoalgésie, et d'autres manifestations physiologiques. Le système de peur semble donc programmé pour répondre de façon adaptée aux dangers naturels et ancestraux qui menacent l'espèce. Néanmoins, si l'individu survit à un danger "nouveau", non inscrit au répertoire des menaces ancestrales, le système de peur acquiert une mémoire de cet événement – c'est-à-dire qu'il est le siège de processus plastiques – et il pourra intervenir immédiatement si la même situation se reproduit. Nous utiliserons dans ce projet, des souris mutées pour le gène Oligophérine (Ophn1), modèle de retard mental, qui montrent des déficits comportementaux importants liés à des dysfonctions du cortex préfrontal médian. Son utilisation permettra de comprendre les mécanismes généraux de la plasticité et de l'apprentissage, et potentiellement contribuer à faire progresser la conception de nouvelles stratégies pour l'amélioration de la mémoire et la réparation neuronale dans un large éventail de maladie du cerveau, incluant donc les pathologies liées à l'absence du gène Ophn1.

Ce lien entre des modifications de la morphologie des neurones et la mémorisation d'évènement, ne peut être étudié à ce jour avec des modèles « in vitro » de neurones en culture. Cent (100) animaux seront utilisés. Pour le respect de la règle des 3R, la qualité de la mise en œuvre des procédures permettra de réduire le nombre des animaux. Les douleurs liées aux chirurgies pourront être soulagées par des molécules anesthésiques et antalgiques efficaces.

3051. La prise en charge de la douleur est une priorité sanitaire relativement récente. Le pharmacien doit être expert en pharmacologie, notamment sur les antalgiques, dans son rôle de la prise en charge des patients, Les médicaments agissent pour corriger une pathologie, mais leur action sur l'organisme est la résultante de multiples effets. C'est pourquoi il est nécessaire de voir l'effet global sur un organisme entier et non pas seulement sur un organe cible ou sur des tissus.

Dans le cadre des études de la lutte contre la douleur, nous proposons des travaux pratiques qui utilisent des tests pharmacodynamiques de mis en évidence de l'effet antalgique.

Les tests pharmacodynamiques utilisés n'ont pas pour but d'induire une douleur, mais de provoquer une réaction de l'organisme dont l'inhibition permet de comprendre le rôle du médicament dans le circuit physiologique de la transmission de la douleur

Pour chacun des 4 tests pharmacodynamiques dont les techniques sont publiées, le nombre d'animaux est réduit à minima càd 3 par lot, soit 21 souris et 6 rats par séance. A chaque séance deux médicaments de classes thérapeutiques différentes pour chaque test pharmacodynamique sont utilisés. l'animal est 1 fois par semaine pendant 5 semaines. Au total 98 souris et 28 rats sont nécessaires par an, soit 490 souris et 140 rats pour 5 ans.

Le médicament est administré par voie intrapéritonéale ou éventuellement par gavage s'il n'est pas très soluble.

Le lot de 3 animaux est volontairement faible et satisfait au R de réduire. Les résultats du test statistique peuvent être néanmoins significatifs.

Les séances sont réalisées dans des salles de TP agréées par les services vétérinaires et les étudiants sont encadrés (3/16) par du personnel compétant et réglementairement formé.

les animaux sont hébergés dans des locaux agréés à raison de 5 rats ou 25 souris par cage avec un enrichissement sous forme de coton végétal, frissures et tunnel.

3052. Le cancer primitif du foie ou carcinome hépatocellulaire (CHC) est le troisième cancer dans le monde en termes de nouveaux cas par an. En parallèle, le cancer du poumon est l'affection tumorale qui fait le plus de victimes dans le monde et représente la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde.

Nous avons accumulé des arguments d'expériences in vitro suggérant que l'effet suppresseur de tumeurs n'est pas restreint au CHC mais il pourrait être élargi à un ensemble de cancers solides y compris le cancer bronchique. Les cancers bronchiques sont classés en deux types : cancers non à petites cellules (les plus fréquents), et cancers à petites cellules (20 % des cas) mais qui restent les plus agressifs. D'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés avec le développement et l'application de nouvelles thérapies ciblant des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses (thérapies ciblées) et adaptées en fonction des caractéristiques morphologiques et moléculaires de la tumeur. Nous montrons, dans des travaux préliminaires, que les cellules cancéreuses bronchiques expriment que peu ou pas le SLAMF3 et que le tissu normal exprime un taux plus élevé. Cette observation nous incite à formuler l'hypothèse de l'effet suppresseur de tumeurs bronchiques par la forte expression de SLAMF3.

De plus, nous montrons une corrélation inverse entre l'expression de certains canaux calciques favorisant la progression du cancer mammaire et l'expression de SLAMF3, ce qui suggère un effet anti-cancéreux de SLAMF3 dans le tissu mammaire cancéreux.

D'autres analyses dans le même sens sont en cours sur d'autres modèles cellulaires de cancers : pancréatique, rénal, colorectal.

Nous avons mis au point un outil expérimental commun nous permettant de suivre la progression des masses tumorales à l'aide d'un bio-imager (plasmide Luc-SLAMF3). De plus, nous disposons des cellules cancéreuses des cancers pré-cités transfectées par le plasmide luciférase afin de suivre la progression des masses tumorales par Bio-Imager.

Nous formulons une demande d'autorisation à l'expérimentation animale afin de vérifier l'effet anti-tumoral de SLAMF3 dans différents cancers solides: cancers bronchiques, mammaires, pancréatiques, colorectaux, rénaux.

Nous nous assurerons du bien être des animaux en contrôlant tous les jours le bien être des animaux en respectant les points limites définis et nous appliquerons la règle des 3R (réduction, raffinement et remplacement). Nous nous engageons à arrêter l'expérimentation lorsque les points limites seront atteints et les animaux seront euthanasiés par dislocation cervicale.

Nous aurions besoin de 210 souris immunodéprimées Nude pour ces travaux.

3053. Il n'existe pas actuellement de traitement curatif de la maladie d'Alzheimer, maladie dont la prévalence est amenée à augmenter régulièrement au cours des prochaines décennies du fait du vieillissement de la population. L'amélioration de la connaissance de la maladie permettra d'identifier de nouvelles possibilités de traitements et de nouveaux marqueurs diagnostiques afin d'améliorer la prise en charge des patients, ce qui est un enjeu crucial de santé publique.

Cette maladie se caractérise par la présence dans le cerveau d'une part de plaques amyloïdes, engendrées par l'accumulation de peptides A $\beta$ , et d'autre part de dégénérescences neurofibrillaires, résultant de l'accumulation d'une forme anormale de la protéine Tau.

L'objectif de ce projet est de faire progresser nos connaissances dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer, et en particulier dans les relations entre le processus de taupathie et la neuro-inflammation, autre composante de la maladie d'Alzheimer.

Différents modèles rongeurs seront utilisés afin de :

1) réaliser des études transcriptomiques (totalité des gènes exprimés dans une cellule) et protéomiques (protéines présentes dans une cellule) des régions atteintes par la taupathie (pathologie due à une anomalie de la protéine Tau, qui intervient dans la stabilité structurale des neurones),

2) caractériser l'évolution de la taupathie induite par injection de vecteurs de transfert de gènes codant différentes formes (normale ou mutée) de Tau,

3) étudier l'évolution de greffes de cellules de types macrophages et monocytes (cellules de défense de l'organisme, attirées par les inflammations) dans différents modèles de taupathie.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus. Leur nombre a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données suffisantes afin de comparer les différentes conditions expérimentales par des tests statistiques préalablement sélectionnés en fonction des questions étudiées. Le projet prévoit d'utiliser un maximum de 1218 rongeurs. Le recours à l'animal est nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité architecturale du cerveau, en particulier les interactions structurelles et fonctionnelles des différents types cellulaires que nous étudierons au cours de ce projet.

Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts standards en élevage et spécifiques aux lignées étudiées, associés au suivi quotidien des animaux hébergés en groupe dans un milieu enrichi, permettent de garantir le bien-être des animaux.

3054. Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale.

Dans l'hypertension ou les maladies rénales, de nouvelles cibles thérapeutiques sont recherchées afin de répondre au besoin médical toujours existant. L'identification de nouveaux candidats médicaments et de leurs mécanismes d'action ne pourra être possible qu'en approfondissant nos connaissances sur les maladies cardiovasculaires.

La souris offre la possibilité de générer des modèles transgéniques de cibles potentiellement impliquées dans la genèse de pathologies cardio-rénales. Ces modèles vont permettre de valider et comprendre plus précisément les mécanismes et voies impliquées par ces cibles ainsi que d'identifier des candidats médicaments modulant ces voies.

Ce projet a plus particulièrement pour objectif de caractériser de nouvelles souches de souris transgéniques pour lesquelles l'inactivation d'un gène (« Knock-Out » de manière constitutive) n'est pas viable et nécessite l'utilisation de constructions génétiques spécifiques dites conditionnelles. L'expression des caractères est alors contrôlée dans le temps, via l'administration aux souris d'un produit : le tamoxifène. Les effets de l'inactivation du gène sur la fonction cardiovasculaire et sa répercussion sur divers organes cibles nécessitent l'utilisation d'un animal. Il n'existe pas de méthode substitutive.

Pour chaque nouveau modèle transgénique à étudier, la délétion du gène et son impact seront évalués grâce à un suivi régulier de l'état général et en fin d'expérimentation, grâce à différentes études spécifiques, comme des dosages biochimiques et mesure de l'expression de gènes d'intérêts dans divers tissus. Différents prélèvements terminaux de sang, d'organes ou tissus en quantité suffisante seront ainsi réalisés pour les évaluations ex vivo et in vitro dédiés à mettre en évidence des différences entre souris sauvages et transgéniques via des dosages biochimiques plasmatiques, tissulaires ou cellulaires, ainsi que dans l'expression de protéines et d'ARNm au niveau des organes et des cellules (cellules endothéliales et cellules musculaires lisses).

Afin de limiter le risque de souffrance pouvant être induit par le traitement au tamoxifène et /ou la délétion du gène, une surveillance poussée permettra d'assurer le respect des points limites et ainsi la maîtrise du risque de souffrance potentielle due à la délétion du gène. Au cours de la mise au point de l'induction et du phénotypage des lignées, l'optimisation des procédures permettra le réajustement à la baisse du nombre d'animaux nécessaire à la bonne conduite de l'étude.

Les prélèvements seront tous réalisés sous anesthésie sans réveil de l'animal.

On peut estimer, sur la durée du projet, une utilisation de 890 souris sur 5 ans, dont une partie concerne des souris témoins (non transgéniques).

Le projet est estimé de degré de gravité modéré, du fait de l'induction de délétions transitoires de gènes codant pour des cibles protéiques, enzymatiques à caractériser.

La caractérisation phénotypique d'une souche de souris transgénique pourra conduire ultérieurement à la mise en œuvre de nouveaux projets adaptés à des fins pharmacologiques.

3055. Le développement de nouveaux médicaments actifs au niveau du système nerveux central nécessite l'étude de leur impact sur les modifications neurochimiques (neurotransmetteurs) dans différentes régions du cerveau ou de la moelle épinière. Ces modifications sont étudiées chez le rongeur, animal de choix classiquement utilisé en neuroscience. Ce modèle permet de corréler les modifications observées au niveau des neurotransmetteurs aux signes comportementaux induits par les candidats médicaments dans la même espèce (rat ou souris). Les effets recherchés chez le rongeur sont ceux qui sont potentiellement bénéfiques chez l'homme : par exemple un candidat médicament qui stimule chez le rongeur la production de dopamine dans une région définie du cerveau présente un intérêt dans le traitement de la maladie de Parkinson chez l'homme.



La complexité du système nerveux central et son implication dans la transmission des informations ne peut pas être remplacée par des méthodes alternatives. Néanmoins, les molécules d'intérêt sont préalablement sélectionnées dans des modèles *in vitro* qui surexpriment des récepteurs spécifiques de façon à ne retenir que les plus prometteuses dans les procédures expérimentales chez le rongeur et réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés. L'effectif des groupes traités est également ajusté au minimum de sujets nécessaires autorisant une analyse statistique pertinente des données mesurées. Enfin, les procédures expérimentales sont raffinées au travers (i) des conditions d'hébergement améliorées par des dispositifs d'enrichissement (tunnel par exemple) et (ii) par l'utilisation autant que possible d'agents anesthésiques locaux et/ou généraux destinés à limiter tout stress, douleur ou souffrance des animaux.

Un effectif maximum de 1500 rats et 1850 souris sur 5 ans (soit 300 rats et 370 souris par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme incluant plusieurs dizaines de molécules par an.

3056. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est un déficit neurologique soudain, causé par un infarctus (accident dit ischémique) ou une hémorragie (accident dit hémorragique) au niveau du cerveau, empêchant un apport sanguin suffisant vers ce dernier. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale, comme l'IRM (technique de choix). Le traitement le plus récent et le plus prometteur de l'accident ischémique semble être la thrombectomie, visant à détruire le caillot responsable de l'occlusion et ainsi restaurer l'apport sanguin (perfusion) du cerveau. Mais cette reperfusion, bien que bénéfique, entraîne également des lésions supplémentaires aux cellules. Le traitement des lésions de reperfusion est donc crucial car il réduit les lésions cellulaires et l'inflammation.

La majorité des essais cliniques a échoué au moment de la translation clinique en raison des trop grandes différences entre le modèle rongeur de l'AVC et la réalité clinique. Le modèle primate est donc un modèle de choix pour ces études. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le primate non humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez ces animaux seront très utiles pour prédire les mêmes phénomènes physiopathologiques chez l'Homme en réponse à un AVC.

Ce projet prévoit donc de mettre en place un modèle d'AVC ischémique avec caractérisation par imagerie TEP/IRM chez le macaque afin d'évaluer, dans une étude ultérieure, l'efficacité d'une molécule d'intérêt ayant déjà fait ses preuves dans le traitement de l'infarctus du myocarde.

Ce projet prévoit au maximum 4 animaux qui proviendront d'un élevage agréé. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel est entièrement formé et complètement accrédité. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par un neuroradiologue interventionnel expérimenté. Les animaux seront sous la responsabilité du vétérinaire.

Les animaux seront suivis individuellement et quotidiennement tout au long de l'étude afin de détecter tout signe de douleur et/ou de détresse. Des mesures préventives et correctives seront également définies en fonction de l'apparition de tout signe clinique de stress ou de douleur, qu'il soit lié au protocole ou non. Des points limites sont définis pour décider de sortir l'animal de l'étude si des effets inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible, et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure du bien-être animal, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

De même, le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations.

3057. L'exposition des embryons d'oiseaux à des températures élevées de manière cyclique pendant l'incubation des œufs améliore la capacité d'adaptation des oiseaux à des environnements chauds après l'éclosion. Nos travaux préliminaires montrant que des mécanismes épigénétiques, c'est-à-dire des modifications persistantes de l'expression des gènes, sont impliqués. Notre objectif est de déterminer les mécanismes moléculaires responsables de l'orientation précoce du métabolisme des oiseaux vers une meilleure thermotolérance, et la persistance de ces changements durant le développement et chez les animaux descendants. En plus de connaissances sur la thermorégulation d'organismes homéothermes, la détermination des mécanismes moléculaires du traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur (TAEC) chez l'oiseau permettra l'optimisation de protocoles d'acclimatation adaptables à différentes conditions d'élevage (saisons, géographie, espèces élevées...). Dans ce projet, nous étudierons les modifications épigénétiques chez des cailles acclimatées ou non à la chaleur pendant l'embryogénèse. La caille, très proche du poulet, présente l'avantage d'un temps de génération court pour réaliser une étude multigénérationnelle compatible avec l'échelle de temps de notre programme de recherche. La faible variabilité génétique spécifique à cette lignée consanguine de caille est un paramètre essentiel pour réduire le nombre d'animaux utilisés et assurer la faisabilité de l'étude sur plusieurs générations.

D'abord, nous validerons le protocole d'acclimatation en réalisant un TAEC sur 330 œufs de caille (au total 660 œufs incluant les témoins) et en mesurant des caractéristiques métaboliques et physiologiques après l'éclosion. Parmi les animaux éclos, 100 traités et 100 témoins de 35 jours seront soumis à une exposition au chaud modérée de 7h à 36°C afin d'évaluer les bénéfices du TAEC sur les cailles (les autres animaux seront maintenus dans des conditions standard d'élevage). Le point limite de l'exposition au chaud a été défini selon deux conditions qui mèneront à l'euthanasie des animaux concernées si celles-ci sont satisfaites : température corporelle  $\geq 44^\circ\text{C}$  et difficulté à haleter, animal couché. Certaines mesures zootechniques réalisées entre 7 à 10 semaines d'âge (ponte, consommation) nécessitent une mise en cage individuelle. Les conditions d'hébergement en cage individuelle seront améliorées par des dispositifs d'enrichissement du milieu

correspondant à des rondelles métalliques faisant office de jouets. Une fois le traitement d'acclimatation validé, nous soumettrons des œufs à un traitement d'acclimatation à la chaleur standard (n=175 œufs ; identique à la tâche 1), des traitements plus courts (4 traitements, n=125 œufs chacun) ou aucun traitement (n=175 témoins). Des échantillons de tissus seront prélevés après l'éclosion à 3 stades du développement pour étudier la dynamique des modifications épigénétiques au cours de l'embryogenèse soit 510 animaux utilisés pour prélèvements. Un sexage par duvet à l'éclosion permettra de réduire le nombre d'animaux mis à mort. Enfin, nous analyserons les changements épigénétiques transgénérationnels induits par le TAEC en échantillonnant des descendants d'animaux traités et témoins pendant 4 générations consécutives. Au total, 1695 animaux seront utilisés dans la globalité du programme. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Les animaux surnuméraires éclos seront remis en élevage dans des conditions standard. La question biologique posée sur la nature de la capacité adaptative d'un animal à la chaleur nécessite l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur des lignées cellulaires.

3058. Le sepsis est un syndrome inflammatoire systémique causé par l'activation incontrôlée des voies inflammatoires et de la coagulation. Cet état peut être provoqué par une infection ou un traumatisme. Le sepsis est la première cause de mortalité dans les unités de soins intensifs, avec une prévalence élevée dans les pays développés (3 cas pour 1000 personnes). Malgré une antibiothérapie adéquate et l'utilisation de traitements lourds, le pronostic vital des patients atteints de ce syndrome n'a été que marginalement amélioré au cours de ces dernières années. Rien qu'aux Etats-Unis, le sepsis cause la mort d'un demi-million de personnes. La complexité de la pathologie explique l'échec de plus de 30 essais cliniques de phase III.

Les anticorps (Ac) jouent un rôle important dans la défense contre les agents pathogènes. Une fraction des Ac, présents chez tous les individus sains, a la capacité de lier différentes molécules pro-inflammatoire et pro-oxydantes de faible poids moléculaire ayant un intérêt biologique. La capacité de certains Ac du répertoire immunitaire d'interagir avec ce type de molécules pourrait jouer un rôle régulateur dans l'homéostasie de l'organisme. Des travaux précédents ont démontré que la liaison de certaines de ces molécules aux Ac confère à ces derniers de nouvelles spécificités de liaisons aux antigènes. Cette liaison leur permet d'accroître leur potentiel de reconnaissance antigénique. Il est intéressant de noter que l'augmentation de la capacité de liaison des Ac aux antigènes corrèle avec l'acquisition d'un fort potentiel anti-inflammatoire. Les anticorps sont en effet bien connus pour leur capacité à réguler la réponse immunitaire.

La signification biologique des Ac ayant la capacité de lier des petites molécules n'est pas bien élucidée. Fait important, le relargage extracellulaire de certaines petites molécules pro-inflammatoires 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 ces molécules, lorsqu'elles sont libérées, ont un potentiel pro-inflammatoire puissant et exacerbent l'inflammation, ce qui contribue à des pathologies, telles que le sepsis.

Des études récentes ont montré que certaines petites molécules pro-inflammatoires jouent un rôle important dans la pathogénèse du sepsis sévère. Nous émettons l'hypothèse que l'administration d'anticorps exogènes capables de lier ces molécules pourrait les capturer et ainsi réduire son impact négatif sur la survie. Nos données préliminaires in vitro, sur des cellules immunitaires humaines, montrent que certains Ac ont un effet anti-inflammatoire et peuvent neutraliser des petites molécules, médiatrices de l'inflammation.

Le modèle animal le plus fiable et le plus pertinent du sepsis est la septicémie polymicrobienne induite par ligature et ponction cœcale (cecal ligation and puncture – CLP) chez la souris. Ce modèle a été utilisé pendant plus de 30 ans et a contribué à générer une masse considérable d'informations sur les mécanismes pathologiques de la septicémie. Le modèle a également été utilisé comme test pré-clinique essentiel pour l'évaluation de nouvelles thérapies de sepsis sévère.

Pour ce projet de 5 ans, nous aurons besoin de 225 souris BALB/c. Nous avons strictement suivi le principe des 3 R durant la conception de ce protocole. Un criblage in vitro sera réalisé pour sélectionner les Ac monoclonaux les plus efficaces et qui seront ensuite utilisés pour les expériences in vivo. Ceci correspond au nombre minimal d'animaux qui nous permettra d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. 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. 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 et de tunnels en cartons).

3059. L'essai chez le malade cancéreux de traitements nouveaux demeure d'actualité et ce d'autant plus que la mise en place de chimiothérapies balancées adaptées à chaque patient est un schéma thérapeutique de plus en plus fréquent. Ce type de stratégie nécessite une importante palette de molécules. Les molécules actives contre la croissance des tumeurs présentent une toxicité importante par rapport à d'autres classes thérapeutiques et, de ce fait, le screening de ces molécules sur des modèles mammifères porteurs de différents types de tumeurs, induites par la greffe de cellules tumorales humaines ou animales est une phase essentielle dans l'estimation de la balance bénéfique/risque des principes actifs nouveaux.

L'essai de nouveaux traitements sur des patients nécessite une évaluation d'efficacité et de tolérance conformément à la directive 2001/20/CE avant l'autorisation de l'essai clinique par un comité de protection des personnes. Les présentes études s'intègrent dans cette démarche. Le présent projet s'insère entre les phases de sélection in vitro de molécules ou de

formulations actives sur des cultures cellulaires tumorales et les premiers essais sur le patient. La phase d'essai d'efficacité sur les petits mammifères présentée ici comporte typiquement trois étapes:

- évaluation de la dose maximale ne présentant pas de toxicité aiguë sur l'animal ;
- pharmacocinétique du principe actif à cette dose maximale tolérée (DMT) ;
- efficacité d'un traitement de trois semaines adapté à la pharmacocinétique et à plusieurs doses inférieures à la DMT sur un ou plusieurs modèles de tumeurs induites sur l'une des trois espèces de rongeurs (souris, rat, hamster) prévues dans ce projet.

Les modèles de cancers prévus sont de plusieurs catégories:

Nous utilisons soit des lignées cellulaires induisant des tumeurs issues de l'espèce de rongeur utilisée comme modèle de l'Homme, soit des lignées cellulaires tumorales d'origine humaine. Ce choix de lignées cellulaires détermine le type de lignée de rongeur qui devra être utilisée. En effet, pour accepter les greffes de cellules d'origine humaine, les animaux doivent être immunotolérants et des lignées de rongeurs présentant différents stades d'immunodéficience sont utilisées dans ce cas.

Le site d'implantation de la tumeur peut être sous cutané et c'est encore aujourd'hui le modèle le plus classique et le plus utilisé pour les essais d'efficacité anti-tumorale de molécules nouvelles. A l'inverse, lorsque cela est possible, l'induction de tumeurs dans l'organe cible naturel des lignées cancéreuses utilisées est souvent plus pertinent pour l'évaluation de l'efficacité du produit testé car l'environnement tissulaire est un élément capital de l'agressivité des tumeurs et de leur résistance aux traitements. Selon le type de modèle, les animaux subissent une simple injection sous cutanée ou une intervention chirurgicale mineure permettant l'injection dans l'organe visé sous contrôle visuel.

Les tests statistiques permettant d'analyser les données de l'étude ont été choisis de sorte qu'un nombre réduit d'animaux soit requis pour l'interprétation des résultats (5 à 12 animaux par groupe), par ailleurs, la détermination de points limites précis (volume tumoral <2000mm<sup>3</sup>, perte de poids <20%, ...) ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur et l'anxiété subie par les animaux au maximum. Cette procédure expérimentale permet d'évaluer l'efficacité de nouvelles thérapeutiques. La complexité des mécanismes biologiques fait que le modèle animal choisi ne peut être remplacé par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants.

Pour nous permettre de réaliser chacune des 10 procédures constituant ce projet global deux fois par an pendant 5 années, le nombre total d'animaux nécessaire est de 1710 souris, 1370 rats et 800 hamsters.

3060. Les glucocorticoïdes (GC) et leurs analogues synthétiques font partie des médicaments les plus prescrits de par leurs propriétés anti-inflammatoires et immunosuppressives. Cependant leurs effets secondaires métaboliques demeurent l'un des éléments limitant de leur utilisation à long terme, puisqu'ils peuvent entraîner le développement d'une intolérance au glucose, d'un diabète ainsi qu'une prise de poids associé à une lipodystrophie (obésité viscérale). Au niveau du tissu adipeux, les GC exercent des effets pléiotropes sur la biologie de l'adipocyte, régulant, in vitro, le métabolisme de l'adipocyte mature ainsi que le processus de différenciation des tissus adipeux. Les GC exercent leurs actions via deux récepteurs, le récepteur des glucocorticoïdes et le récepteur des minéralocorticoïdes. Toutefois, le rôle de ces récepteurs dans les effets des GC sur la physiologie du tissu adipeux reste à déterminer.

Ce projet vise à étudier, in vivo, le rôle du récepteur des glucocorticoïdes (GR) en tant que relai moléculaire des effets des GC sur les processus de différenciation des tissus adipeux, et sur les fonctions de ces tissus, qui jouent un rôle prédominant dans le contrôle de l'homéostasie glucido-lipidique.

Ainsi nous utiliserons deux modèles murins d'inactivation du récepteur des GC spécifiquement dans le tissu adipeux, par une approche constitutive et inductible. Grâce à ces modèles murins, nous explorerons, in vivo, les conséquences de l'inactivation du GR sur le développement des tissus adipeux blancs et bruns ainsi que leurs fonctions métabolique, sécrétrice et thermogénique. Nous analyserons également les mécanismes à l'origine des désordres métaboliques observés dans un contexte pathologique obésigène. L'étude de ces modifications mettra en évidence de nouvelles pistes physiopathologiques afin de palier les effets secondaires chez les patients traités par des GC ou atteints de syndrome de Cushing (caractérisé par une élévation des GC endogènes).

Type d'animaux : Modèles murins d'inactivation du récepteur des GC spécifiquement dans le tissu adipeux de façon constitutive et inductible.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 700 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : La pierre angulaire de ce projet est l'utilisation de souris invalidées pour le gène du récepteur des GC, il ne nous est pas possible de remplacer ces animaux. Un système vivant est nécessaire pour étudier les acteurs mis en jeu dans le développement du projet. Il n'est pas possible de recréer in vitro la complexité d'un organisme entier avec tous les acteurs cellulaires entrant en jeu.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation,

les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

3061. Il existe chez les animaux et l'Homme une mémoire des impacts précoces de l'environnement embryonnaire (nutrition, stress, polluants...) qui participe au phénotype des individus. Ainsi, la compréhension des mécanismes d'action de l'environnement précoce, influencé par l'alimentation maternelle et les pratiques d'élevage pour les animaux de rente, représente une réelle opportunité pour améliorer la santé et le bien-être des animaux. L'environnement impacte les organismes en modulant leurs programmes d'expression de gènes contrôlant notamment le métabolisme via des modifications épigénétiques, c'est-à-dire des changements d'expression héréditaires sans altération de la séquence d'ADN, porteuse de l'information génétique. En conséquence, ces modifications épigénétiques peuvent être à l'origine de changements affectant la réaction à de nouveaux stimuli environnementaux ou le risque de développer certaines pathologies. L'oiseau, de par son développement embryonnaire dans l'œuf, est une espèce agronomique de choix pour étudier l'impact de l'environnement embryonnaire sur le devenir de l'animal. Dans un contexte de réchauffement climatique, il est possible d'améliorer la résistance et le bien-être des poulets de chair à la chaleur en augmentant de manière cyclique la température d'incubation des œufs à du septième au seizième jour de l'embryogénèse. Ce traitement d'acclimatation embryonnaire à la chaleur (TAEC) permet d'améliorer la thermotolérance des animaux à l'âge d'abattage (avec une réduction de moitié de la mortalité des mâles) sans impact significatif sur l'éclosabilité, le bien-être ni la qualité des animaux. Le TAEC est associé à des changements d'expression de gènes qui perdurent durant le développement des animaux, suggérant que des modifications épigénétiques influencent la régulation des gènes contrôlant le métabolisme et la physiologie des animaux.

L'objectif du projet est de déterminer les mécanismes épigénétiques permettant d'orienter le métabolisme des oiseaux vers une meilleure thermotolérance suite à l'exposition précoce à la chaleur. Ces travaux comprennent une étude cinétique de l'établissement des marques épigénétiques associées avec le traitement d'acclimatation pendant l'embryogénèse et post-éclosion pour comprendre quand celles-ci sont établies et étudier leur stabilité dans le temps. Nous modifierons certains paramètres du TAEC (réduction de la durée du traitement ou changement du moment d'application) pour comprendre l'influence du traitement sur les changements moléculaires mais aussi pour pouvoir réduire et/ou adapter le traitement à différentes conditions d'élevage sans impacter son efficacité. Nous mettrons en incubation 960 œufs provenant d'un élevage commercial de lignée Cobb™. 240 œufs seront utilisés avant éclosion pour une étude des effets moléculaires directement lors de l'embryogénèse. Après éclosion, nous utiliserons 576 animaux, élevés au sol. 200 mâles seront prélevés (n=60 à l'éclosion et n= 140 à J34), en réduisant respectivement le nombre d'animaux prélevés à 10 poussins/traitement à l'éclosion (nombre d'échantillons individuels nécessaire d'après nos expériences précédentes) et à 20 ou 30/traitements pour obtenir la quantité de tissu cumulée (notamment hypothalamique à J34) nécessaire à nos mesures biochimiques et moléculaires. Les animaux surnuméraires éclos, dont les femelles, seront remis en élevage. Seuls des mâles seront utilisés dans cette étude afin de la rendre complémentaire et comparable aux études physiologiques précédentes dans lesquelles un effet a été observé principalement pour ce sexe. Ce nombre d'animaux est nécessaire et suffisant pour pouvoir tirer des conclusions significatives en tenant compte de la variabilité interindividuelle attendue d'après nos expériences précédentes. La question biologique posée sur la nature de la capacité adaptative d'un animal à la chaleur nécessite l'utilisation d'animaux vivants pour cette étude et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur lignées cellulaires.

3062. Au cours de ses études sur la rétinite pigmentaire, l'équipe a identifié que le gène *Nxn1* codait pour 2 formes d'un facteur impliqué dans la protection des photorécepteurs : RdCVF et RdCVFL (forme longue). La forme courte résulte d'un défaut d'épissage de l'ARN entraînant un arrêt prématuré de la traduction par apparition d'un codon Stop. Par ailleurs, l'équipe a montré que les bâtonnets expriment les deux formes de RdCVF (50% RdCVF/50%RdCVFL) alors que les cônes expriment uniquement la forme longue du facteur (100%RdCVFL). Il est important de préciser que RdCVF sécrété par les bâtonnets a une fonction protectrice sur les cônes et permet leur survie. Dans la rétinite pigmentaire, c'est la dégénérescence primaire des bâtonnets qui entraîne la dégénérescence secondaire des cônes par défaut de RdCVF (forme courte).

Dans ce projet nous aimerions comprendre les mécanismes qui empêchent l'épissage de l'ARN au niveau des photorécepteurs et ainsi la synthèse de RdCVF (forme courte). Nous injecterons à des souris sauvages (fond BALB/c) différentes constructions qui nous permettront de définir la séquence impliquée dans ce mécanisme. Au total 280 animaux seront nécessaires à cette étude. Les rétines des animaux injectées seront récupérées pour des études génétiques, biochimiques et histologiques. Il n'existe pas à ce jour de modèles de culture cellulaire qui nous permettrait de mener à bien cette étude in vitro.

Cette recherche purement fondamentale dans un premier temps pourra dans l'avenir permettre d'explorer une nouvelle voie thérapeutique dans le traitement de la rétinite pigmentaire (faire synthétiser par les cônes le RdCVF (forme courte). L'avantage de cette thérapeutique par rapport à celles testées actuellement, est qu'elle ne nécessitera pas l'utilisation d'outils viraux.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle animal. 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 ».

3063. L'équipe s'intéresse aux bases neurales de la navigation spatiale. Lorsque nous effectuons un trajet familier nous nous repérons aux objets présents autour de nous mais également aux mouvements de notre propre corps. Nous sommes ainsi capables de nous représenter notre corps dans l'espace tout en nous déplaçant. Cette carte mentale est formée grâce à l'action de nombreuses structures cérébrales interagissant entre elles et nous permettant ainsi de nous déplacer vers un but de manière optimale. Nous avons ainsi montré que le cervelet intervient dans la construction mentale de la représentation de l'espace dont le siège se situe au niveau de l'hippocampe. Nous cherchons maintenant à clarifier les mécanismes permettant au cervelet de participer à cette représentation mentale et à réaliser une carte détaillée de la connectivité cérébello-hippocampique au niveau électrophysiologique. « Nous utiliserons sur 5 ans un total de 40 souris. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de générer des données statistiques solides ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte des temps de récupération et des nombres d'essais visant à réduire le stress et la fatigue des animaux ; 3) remplacement, les études in vitro et sur animaux invertébrés ne permettent pas l'étude de comportements complexes ; le rongeur est donc une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude. »

3064. Les conjugués anticorps-médicaments (ADC) sont de nouvelles thérapies anticancéreuses ciblées. Les ADC se composent de trois fragments : l'anticorps, le médicament et le linker qui les relie ensemble.

1. L'anticorps joue le rôle d'agent de ciblage. Il est conçu pour reconnaître sélectivement les cellules cancéreuses, en se liant spécifiquement à un type de récepteur surexprimé à la surface de cellules malades. Cette approche de ciblage permet de réduire considérablement les effets secondaires par rapport à la chimiothérapie classique.

2. Le médicament est un agent chimiothérapeutique qui vise à détruire les cellules malignes lors de sa libération. Ainsi, il peut induire la régression, partielle voire complète, de la tumeur.

3. Le linker lie l'anticorps et le médicament de façon covalente. C'est un fragment crucial dans les ADC : il doit être extrêmement stable en circulation sanguine, mais induire la libération du médicament dans l'environnement de la tumeur. En effet, le linker a été conçu pour être cassé par une molécule présente uniquement dans la tumeur, libérant ainsi le médicament localement.

À ce jour il n'existe pas de méthode efficace permettant le relargage extracellulaire du médicament. Pour cette raison, il est généralement considéré que les ADC sont uniquement adaptés aux cibles internalisantes. De nombreuses cibles non-internalisantes restent ainsi encore hors de portée de ces thérapies novatrices et particulièrement performantes. La technologie nouvelle génération de relargage d'agents chimiothérapeutiques en milieu extracellulaire ici testée, combinée à la spécificité des ADC, permet aujourd'hui de décupler les possibilités de thérapie anti-cancéreuse. Ce qui est proposé ici est de tester et valider l'efficacité de la libération d'un agent chimiothérapeutique dans le microenvironnement tumoral chez un organisme multicellulaire évolué, la souris. L'utilisation de cette technologie a pour but d'éliminer partiellement ou totalement la tumeur, et ce, de façon plus efficace et sans effet secondaire pour les patients par rapport aux thérapies actuelles.

Pour cette étude, il est indispensable d'utiliser un modèle animal. Le remplacement par des modèles alternatifs n'est pas possible, tels que des modèles in vitro, étant non représentatifs de la complexité biologique de l'organisme dans son ensemble. Pour réduire le nombre de souris nous allons effectuer un test pilote avec des souris Swiss Nude. La taille des groupes expérimentaux sera fixée à n=10 animaux/traitement et pourra être réduit en fonction de la variabilité biologique observée lors du test pilote. Au total, 130 souris seront utilisées dans ce projet.

Dans le cadre de raffinement, nous avons déjà déterminé la toxicité des ADC dans les tests in vitro (MTS test). Cela nous permet de choisir une gamme de concentration d'ADC optimale d'utilisation in vivo. Dans le cadre de l'étude in vivo, ces cellules seront injectées par voie sous-cutanée (SC), et les différents traitements seront administrés par voie intraveineuse (IV), une fois la tumeur implantée. Afin d'éviter toute souffrance, l'état général des animaux sera suivi de près quotidiennement après administration des cellules et des ADCs. L'identification de symptômes de détresse entraînera l'euthanasie des souris concernées.

3065. Les maladies cardiovasculaires constituent l'une des premières causes de décès dans les pays développés. Un des facteurs de risque majeur de ces maladies est l'hypertension artérielle définie par une pression supérieure ou égale à 140/90 mmHg. Le 26,4% de la population mondiale adulte seraient hypertendues, à l'horizon 2025, il a été estimé que 1,56 milliard de sujets seront touchés par l'hypertension artérielle. En Afrique subsaharienne, l'hypertension artérielle touche environ 27 à 28% de la population adulte âgée de 20 ans et plus. Prévalence de l'hypertension artérielle est de 11% au Togo, du 13% au Bénin et en Côte d'Ivoire et du 23% au Burkina Faso. Le traitement l'hypertension artérielle est onéreux, à vie et d'accès difficile dans ces pays. Pour cela la population fait recours à la Médecine et pharmacopée Traditionnelles (MPT).

Selon l'OMS (2002), plus de 80% des populations africaines ont recours à la MPT. Cependant, les propriétés biologiques des extraits d'écorces de troncs de *Lannea microcarpa* sont méconnues. L'intérêt de cette étude est de valoriser les plantes médicinales du Burkina Faso dans le cadre d'une phytothérapie de l'hypertension artérielle.

Pour cela, parmi les différents modèles disponibles à ce jour, le modèle d'hypertension artérielle induite par des pompes d'angiotensine II apparaît comme étant le plus pertinent. Nous allons également évaluer les effets des extraits sur des souris témoin qui recevront les mêmes procédures expérimentales afin d'obtenir des contrôles non hypertendus.

Un total de 120 souris sera utilisé.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés. L'induction d'une hypertension artérielle à l'aide de pompes d'angiotensine II a un caractère de stricte nécessité et ne peut pas être remplacées par d'autres

méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants et susceptibles d'apporter le même niveau d'information;

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum (n=30 par groupe) sans compromettre les objectifs du projet.

Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

Ces données devraient permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action des extraits d'écorces de troncs de *Lannea microcarpa* et envisager leur utilisation dans la phytothérapie de l'hypertension artérielle.

3066. L'objectif de nos travaux consiste à étudier les mécanismes pathologiques de la maladie d'Alzheimer (MA) et de l'infertilité masculine. Le but est de caractériser des marqueurs permettant la compréhension de la pathologie et son diagnostic.

De nouvelles formes protéiques ont été identifiées au sein du laboratoire, les outils nécessaires à leur validation et à leur caractérisation n'existent pas à ce jour. Notre objectif est de développer un panel d'anticorps monoclonaux afin de les détecter et ainsi confirmer ces résultats

Notre projet répond aux exigences des 3R, à savoir remplacement, réduction et raffinement. Nos procédures sont établies de façon à réduire le nombre d'animaux et nous optimisons leur utilisation. Le nombre total d'animaux concernant ces procédures sur les 5 ans à venir est estimé à 240 souris. Les animaux seront suivis de façon à déceler les points limites éventuels et sacrifier les animaux dans une pièce dédiée en accord avec la structure du bien être animal.

3067. Des études épidémiologiques montrent que la malnutrition maternelle prédispose la progéniture à des troubles métaboliques à l'âge adulte. En effet, il est clairement établi chez l'homme que les enfants nés avec un petit poids de naissance ont un risque accru de développer avec l'âge un diabète de type 2. Ce diabète est caractérisé par une hyperglycémie due à une résistance à l'insuline et une sécrétion d'insuline insuffisante, l'insuline étant la seule hormone hypoglycémisante. Différents modèles animaux ont été développés pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans ces phénomènes de programmation métabolique. Parmi ces modèles, celui de carence protéique (CP) maternelle est le mieux caractérisé et celui que nous utilisons depuis plusieurs années. Le régime CP administré pendant la gestation et la lactation est isocalorique et n'entraîne aucune mortalité ni souffrance particulière sur la progéniture. Il n'a aucun effet en terme de perte de poids sur les mères (ou sur le nombre de petits par portée) par contre il induit un retard de croissance intra-utérin de la progéniture. Il ne s'agit pas de perte de poids qui pourrait consister un point limite puisque la descendance CP prendra du poids normalement avec l'âge en conservant ce retard de croissance.

Concernant l'aspect métabolique, les animaux CP développent un phénotype en deux phases. Les jeunes rats CP ont une glycémie normale malgré une sécrétion d'insuline très faible. Cependant avec l'âge les rats CP deviennent résistants à l'insuline et hyperglycémiques. Ainsi, la normoglycémie doit être maintenue chez les jeunes rats CP grâce à une compensation métabolique. Comme le tissu adipeux brun (TAB) est connu pour brûler les lipides et les glucides et par conséquent participer à l'homéostasie énergétique, nous avons étudié son rôle potentiel dans la normoglycémie de cette jeune descendance CP.

Nous avons constaté au cours de nos travaux (MESR N°00825-01) que la jeune descendance CP dissipe plus d'énergie, présente un TAB hyperactif et est protégée contre l'obésité induite par une alimentation riche en graisses et en sucres. Avec l'âge l'activité de leur TAB décline de façon concomitante avec l'apparition de la résistance à l'insuline et l'augmentation de leur glycémie vers 18 mois. Enfin, nos travaux sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation/désactivation du TAB ont révélé une dérégulation de l'expression de certains microARNs dans le TAB de la progéniture CP comparée à celle de la progéniture contrôle, fournissant ainsi un mécanisme potentiel pour le phénotype dépendant de l'âge observé.

Afin de mieux comprendre le rôle du TAB et des microARNs dans la programmation fœtale de la dérégulation du métabolisme glucidique, ces travaux doivent être complétés. Considérant nos résultats préliminaires nous avons deux objectifs distincts. Le premier objectif est de déterminer si le TAB est requis *in vivo* pour le maintien de la normoglycémie chez cette descendance en procédant à l'ablation totale du tissu.

Le deuxième objectif consiste à valider *in vivo* l'implication de microARNs candidats (préalablement validés *in vitro*) dans l'hyperactivation du TAB de ces jeunes animaux en les injectant directement dans le TAB de rats CP âgés de 3 mois. Enfin, nous nous intéresserons au potentiel effet de ces microARNs dans la lutte contre l'obésité et l'hyperglycémie. Ainsi cette stratégie d'injection de microARNs *in situ* suppose l'obtention de modifications de l'état d'activation du TAB pouvant entraîner la réversion des phénotypes de nos rats (CP et obèses).

Les bénéfices attendus de ce projet pourraient permettre une intervention précoce face à l'influence de l'alimentation maternelle sur la santé de l'enfant et avoir un impact important sur la prévalence du DT2.

Ces animaux seront non modifiés génétiquement et seront maintenus dans des conditions standard d'hébergement. L'ensemble de ces procédures nécessitera 744 rats.

3068. Le but de ce projet est d'analyser le rôle de cellules de l'immunité innées de type 2 (ILC2) dans des modèles d'inflammation allergique et de tumorigénèse chez la souris.

A l'aide de modèles de souris déficientes pour les cellules lymphoïdes innées et des transferts adoptifs de ces cellules, nous allons déterminer l'effet de ces cellules dans des modèles de tumorigénèse ainsi que dans des modèles d'inflammation allergiques. Nous utiliserons des modèles de mélanome et de métastase aux poumons par des transferts de cellules de

mélanome murin de type B16-F10. Les modèles d'inflammations allergiques seront induits par l'utilisation d'IL-33 ou d'allergènes.

Ce projet nécessite des expériences chez l'animal car nous devons travailler dans des conditions intégrées permettant l'interaction de plusieurs systèmes cellulaires complexes dont le microenvironnement inflammatoire et tumoral. Ces analyses ne peuvent pas être réalisées à ce jour in vitro. Nous avons choisi d'utiliser un modèle murin car les outils et les systèmes de transgénèse chez la souris sont très développés.

Ce projet, avec ces différentes étapes, nécessite l'utilisation de 1861 souris (nombre maximum qui pourrait être réduit si certaines parties du projet se révèlent infructueuses).

L'ensemble des procédures fait l'objet d'expériences pilotes afin de valider les conditions expérimentales, temps de traitement, nombre d'animaux par groupe nécessaire aux analyses et validation statistiques. Le suivi des animaux est quotidien, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au minimum permettant d'atteindre des valeurs statistiques correctes et les temps de traitement ont aussi été optimisés afin d'engendrer le moins de stress possible pour l'animal. Les analyses sont réalisées par cytométrie en flux et RT-PCR quantitative ce qui permet de suivre de très nombreux paramètres simultanément sur un échantillon unique, réduisant ainsi le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

3069. En 15 ans, la production mondiale de viande de lapin a progressé de 45%. Les élevages de lapins sont cependant très sensibles aux maladies, parmi lesquelles la pasteurellose est la maladie bactérienne la plus répandue. Ces bactéries, transmissibles à l'homme, sont responsables de pathologies variées chez le lapin adulte (abcès, problèmes respiratoires, avortements) mais provoquent surtout une mortalité des lapereaux après le sevrage. Elles ont conduit à l'utilisation excessive d'antibiotiques, ce qui affecte l'environnement et induit un risque de développement de bactéries antibio-résistantes. La sélection pour la résistance des animaux à la maladie est une voie essentielle pour développer des systèmes d'élevages durables. Associant généticiens, pathologistes et immunologistes et soutenu par la filière cunicole, ce projet a pour but d'inoculer expérimentalement une population de 1000 lapins représentatifs du cheptel européen, de mesurer finement leur réponse à cette infection et d'étudier les variations de leur génome afin de détecter les régions du génome associées à la résistance à la pasteurellose. Un lot de 50 lapins supplémentaires non infectés servira de témoins. Les résultats de ce projet permettront de définir des stratégies de sélection en partenariat avec les sélectionneurs français pour améliorer la résistance à la pasteurellose chez les lapins d'élevage.

Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3 R.

Remplacement : La détection de régions du génome associées à la résistance à la pasteurellose chez le lapin d'élevage ne peut être obtenue qu'après infection expérimentale de *Pasteurella* des animaux.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé est le minimum nécessaire détecter et qualifier des facteurs génétique de résistance à la pasteurellose

Raffinement : les groupes sociaux sont maintenus, avec le respect des groupes d'animaux formés après le sevrage lors du transport et de leur mise en cage. Les cages sont enrichies pour améliorer le bien-être des animaux (repose-pattes, tunnel, tasseaux de bois à ronger).

3070. L'objectif de ce projet est de visualiser en imagerie par résonance magnétique (IRM) le passage de la barrière hémato-encéphalique (BHE) de 5 peptides d'intérêt marqués au gadolinium chez la souris MRL/lpr, modèle murin du lupus. Il s'agit d'une maladie auto-immune complexe et au diagnostic difficile. Inflammatoire, chronique, c'est une affection qui touche majoritairement les femmes et dont les symptômes et leur gravité varient beaucoup d'une personne à l'autre. Les atteintes peuvent être dermatologiques, rhumatologiques, rénales, mais également cérébrales (chez au moins 75% des patients). Cette forme délicate de la maladie, encore très mal connue, constitue le lupus neuropsychiatrique ou neuro-lupus. Des anomalies structurelles au niveau cérébral sont observées chez les patients et pourraient être à l'origine des perturbations cognitives observées. Deux (P140 et 88-99 H4) des 5 peptides de l'étude ont déjà été testés dans ce modèle animal et l'un d'entre eux (P140) est en essai clinique avancé chez des patients lupiques. Les 3 derniers sont en cours de développement.

Nous désirons poursuivre ces recherches en complétant les études précédentes déjà réalisées sur ce modèle, en regardant si les 5 peptides peuvent passer la BHE par le biais de ruptures de l'intégrité de cette membrane et s'accumuler dans le cerveau à différents stades de la pathologie. Cette maladie étant évolutive, nous étudierons les effets des peptides à 2 âges différents des souris, à savoir 11 et 17 semaines. Nous tenterons de localiser cette accumulation grâce à l'utilisation de l'IRM.

Chaque peptide sera testé sur les souris MRL/lpr et leur contrôle MRL +/+ ainsi que sur un groupe témoin de souris saines BALB/c à raison de 5 souris par groupe et à 2 âges différents, ce qui fait un total de 300 souris sur 5 ans.

Afin de respecter au mieux la règle des 3R, nous allons:

-Réduire: Nous n'utiliserons que 5 animaux par groupe, 5 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce modèle qui présente une grande variabilité inter-individuelle. De plus, l'imagerie nous permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure.

-Raffiner: Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux.

-Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des souris car l'objectif du travail est de visualiser les zones de ciblage et localisation cérébrales de peptides utilisés dans le traitement de cette pathologie.

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann et Whitney, adéquat pour les petits effectifs.

3071. La schizophrénie est un trouble mental caractérisé par une série de symptômes positifs, négatifs ou cognitifs mais également par la particularité de présenter une prévalence élevée d'usage problématique de drogues y compris l'alcool. Alors

que plus de 80% des schizophrènes sont des fumeurs, la deuxième drogue la plus consommée est l'alcool (> 50%), avec des conséquences dramatiques sur la fréquence et l'intensité des épisodes psychotiques et sur l'espérance de vie. Au cours d'études précédentes nous avons utilisé un modèle neurodéveloppemental murin de la schizophrénie pour étudier l'effet d'une consommation précoce (adolescence) sur les consommations d'alcool ultérieures (âge adulte). Les rats modèles de schizophrénie montrent une perte de contrôle de leur consommation d'alcool ainsi qu'une plus forte motivation à consommer de l'alcool toutes 2 associées à une résistance à l'extinction du comportement d'auto-administration d'alcool.

Par ailleurs il est connu que les patients atteints de schizophrénie mais aussi ceux atteints d'alcoolodépendance présentent des perturbations des processus de prise de décision avec une tendance à faire des choix non pas sur le bénéfice réel qui peut être obtenu mais basé sur l'impulsivité. Au cours de ce projet nous mettrons en place dans 2 modèles animaux de schizophrénie, un phénotype de consommation excessive d'alcool sous forme de « binge-drinking ». Puis dans ces modèles nous étudierons l'implication des systèmes dopaminergique et glutamatergique au cours d'études comportementales (prise de décision entre plusieurs choix plus ou moins récompensants pour les rats). Ces études se feront soit par mesure directe de libération de dopamine pendant que l'animal réalise le comportement demandé, soit par étude sur tissu cérébral après prélèvement. En fonction des expériences menées nous utiliserons des groupes de 20 ou 10 rats pour permettre de minimiser au maximum le nombre d'animaux tout en conservant une puissance statistique suffisante pour nous permettre d'observer des différences entre les groupes. De plus nous utiliserons les rats soumis à l'expérience comportementale pour les études d'électrophysiologie ex vivo et d'études géniques et protéiques. Il est important de noter que nous utiliserons tous les petits, mâles et femelles au cours de ces expériences, d'une part pour étudier l'effet genre dans notre projet mais également dans l'optique d'utiliser tous les petits de chacune des portées et ainsi éviter toute euthanasie des femelles dès la naissance ou au sevrage. Tout au long de nos expériences, les rats feront l'objet d'une surveillance importante pour éviter au maximum toute souffrance ou douleur qui pourrait intervenir. Dans le cas contraire, les soins appropriés seront apportés par du personnel qualifié et expérimenté. Un analgésique de type morphinique (Buprénorphine) sera administré en cas de détection de douleur/souffrance. Pour que nous puissions effectuer différentes mesures de consommation d'alcool totalement individualisée, les animaux seront hébergés seuls dans leur cage de stabulation. Un total de 2352 rats sera utilisé dans ce projet. Ces modèles de schizophrénie n'ont été décrit que chez le rat pour le moment, il nous est donc impossible à l'heure actuelle de réaliser nos expériences avec d'autres animaux ou des modèles computationnels.

3072. L'étymologie nous apprend que le macrophage est littéralement un « gros mangeur », engloutissant débris cellulaires ou pathogènes présents dans les tissus qu'il infiltre. En réalité, les macrophages sont des cellules très versatiles dont les propriétés dépendent étroitement de leur localisation tissulaire et des contextes pathologiques dans lesquels ils interviennent.

Dans cette fratrie hétérogène, on distingue à un extrême, des macrophages « classiques » (pro-inflammatoires), puissants tueurs de microbes envahisseurs ou de cellules cancéreuses et, à l'autre, des macrophages « alternatifs », nichés dans les tumeurs qui favorisent la formation de vaisseaux sanguins nécessaires à leur croissance et à leur dissémination, et qui inhibent fortement la réponse anti-tumorale. De nombreuses études cliniques ont d'ailleurs établi une corrélation entre infiltration des tumeurs cancéreuses par ces macrophages « alternatifs » et diminution de la survie des patients.

Cette apparente contradiction - deux fonctions opposées potentiellement portées par la même entité - représente bien ce que peut devenir une cellule immunitaire selon les signaux qu'elle reçoit et les partenaires avec lesquels elle communique. Il est donc impératif d'étudier la plasticité des macrophages en fonction du contexte environnant : en effet, cet environnement varie beaucoup selon que les macrophages sont présents dans un tissu sain ou dans une tumeur ; et la multiplicité des types cellulaires et de leur interaction au sein d'une tumeur ne peut être complètement reconstituée in vitro.

L'objectif de ce projet est d'analyser comment les tumeurs recrutent les macrophages et polarisent leur fonction à leur avantage : pour cela nous devons analyser des modèles appropriés développés chez la souris qui récapitulent le développement tumoral observé chez les patients. L'utilisation de souris dans ce projet se justifie aussi par l'analyse de modifications génétiques qui régulent la fonction des macrophages.

Afin (1) de diminuer le nombre d'animaux enrôlés dans ce projet, (2) de suivre au plus près la croissance tumorale et donc de limiter la souffrance associée, nous utiliserons une technique d'imagerie non invasive permettant des analyses longitudinales. Enfin, il faut noter que la multiplicité des types cellulaires et de leur interaction au sein d'une tumeur ne peut être complètement reconstituée in vitro et oblige donc à conduire ces analyses in vivo.

En conclusion, la mise en œuvre du projet respectera la règle des 3Rs et des mesures seront prises pour atténuer la douleur et le stress des animaux. Les conditions d'hébergement des souris respecteront la DIRECTIVE 2010/63/UE (surface des cages; matériel pour confectionner des nids; Température/Hygrométrie/Photopériode contrôlées).

(Estimation du nombre total de souris utilisées pour le projet: 1000)

3073. L'objectif principal de ce projet est de mieux comprendre comment les cartes visuelles se forment au cours du développement pour assurer une correcte représentation du monde extérieur. Comprendre comment les connexions sont établies et raffinées au cours du développement cérébral est crucial pour appréhender et prévenir les défauts se produisant au cours des pathologies neurodéveloppementales. De plus, l'établissement correct des cartes visuelles étant crucial pour une vision adéquate, les résultats de nos recherches permettront de mieux comprendre les défauts visuels se produisant dans certaines pathologies visuelles ou oculomotrices comme l'albinisme, l'amblyopie, le strabisme et le nystagmus. Ce projet a l'avantage de combiner des approches variées de génétique de la souris, une technique d'électroporation permettant l'expression de molécules d'intérêt dans la rétine ou dans le cerveau avec de la culture cellulaire, du traçage neuronal et des



méthodes histologiques pour déterminer le rôle des ces gènes dans la formation et le raffinement des cartes visuelles. Nous avons détecté des défauts de projections visuelles chez certaines lignées mutantes et cherchons à les caractériser plus précisément afin de comprendre le lien entre le gène délété et la conséquence phénotypique sur les projections visuelles et donc la fonction de ce gène.

Nous étudions principalement l'organisation des projections rétiniennes dans le cerveau de souris, qui est trop complexe pour être entièrement modélisé *in vitro* par culture cellulaire. Afin de réduire au maximum l'utilisation d'animaux, nous avons développé la technique d'électroporation (*in utero* et postnatale) pour marquer les axones rétiniens et également inactiver ou surexprimer des gènes de manière locale et aigüe dans la rétine ou le cerveau chez la souris. Cette technique a l'avantage d'être rapide et de réduire le nombre de souris nécessaire par comparaison aux méthodes classiques de génération de lignées de souris mutantes. Des travaux précédents nous ont permis de valider les techniques d'inactivation et donc de minimiser le nombre d'animaux requis afin de comparer d'une manière statistique la condition mutante à la condition contrôle. Pour ce projet, nous pensons utiliser 1348 animaux (60 adultes, 72 femelles gestantes et 112 portées) répartis entre souris "normales" (C57BL6), souris avec mutation spontanée (Albino, Tyr-c) et souris transgéniques (Plexine-A1-KO, Sema6D-KO, RIMcDKO). Grâce à cette méthode nous testerons le rôle de différents gènes dans la formation et le raffinement des cartes visuelles.

Nous utiliserons également toutes les techniques nécessaires afin de limiter ou supprimer la douleur au cours de ces procédures par des méthodes d'anesthésie et d'analgésie adaptées. Les animaux seront examinés régulièrement pour détecter tout signe de stress et/ou douleur qui pourrait nuire à la santé de l'animal et de ce fait à nos expériences. Des points limites précis ont été élaborés pour arrêter les procédures s'ils sont atteints. Les méthodes d'euthanasie adaptées seront utilisées en fin de procédure.

3074. Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. Un vaccin préventif induisant des anticorps actifs contre le VIH serait le moyen le plus efficace de diminuer la propagation du virus et d'éliminer la pandémie. Un rôle protecteur d'un type particulier d'anticorps, les anticorps non-neutralisants (AcNN), est suggéré par les résultats encourageant de l'essai clinique RV144. Dans cet essai vaccinal, une diminution du risque d'infection a été corrélée à la présence d'AcNN. De plus, une application locale d'AcNN au niveau des sites muqueux de transmission est capable de diminuer la réplication virale après infection et de limiter le nombre de virus transmis chez le primate non humain (PNH).

Le but de ce projet est d'analyser le rôle protecteur des AcNN lorsqu'ils sont transférés passivement par voie intraveineuse. Notre hypothèse est que le transfert passif permettra d'augmenter la concentration des AcNN au niveau des tissus cibles du virus par rapport à une application locale comme précédemment réalisée et donc d'obtenir une meilleure activité protectrice. Le projet prévoit 1) une étude de pharmaco-distribution des AcNN puis 2) une étude d'évaluation de l'efficacité protectrice des AcNN. Ce projet sera réalisé chez le PNH qui est à l'heure actuelle le seul modèle pertinent de l'infection de l'homme par le VIH. Ce projet permettra de définir le rôle protecteur des AcNN et contribuera à l'optimisation des futurs vaccins anti-VIH.

Le projet prévoit au maximum 30 PNH nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux est réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques non paramétriques pour permettre l'interprétation des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux : immunisations, inoculation virale et prélèvements de sang et de fluides muqueux sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition d'effets inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe avant infection puis en hébergements individuels contigus permettant des interactions sociales. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule « bien-être animal » de l'établissement.

3075. L'anthropisation du milieu, en particulier l'expansion des zones agricoles, va modifier la dynamique naturelle des ressources alimentaires. L'exploitation des cultures apparaît alors comme une alternative offrant aux animaux un accès rapide à des ressources très énergétiques. Cependant, ils seront confrontés à des incertitudes quant à la prévisibilité des ressources disponibles et aux dangers liés à l'exploitation de zones protégées. Différentes stratégies cognitives et sociales peuvent alors être mises en place pour gérer cette incertitude. L'incursion des groupes de babouins dans les cultures (crop-raiding) constitue une expérience à ciel ouvert pour étudier les facteurs individuels et sociaux impliqués dans ces décisions de groupe, déterminer les mécanismes permettant l'émergence et le maintien de stratégies d'approvisionnement collectives en situation d'incertitude et revisiter les théories relatives aux stratégies anti-prédatrices. Dans ce projet, il s'agit d'évaluer en conditions contrôlées l'attitude face au risque chez des mâles babouins adultes lors d'une tâche de choix alimentaire en fonction du degré de risque représenté par un compétiteur humain. Ce travail constitue la première phase d'un programme de recherche qui vise à étudier les processus de négociation et de prise de décision lors du crop-raiding des babouins chacma (*Papio ursinus*) vivant dans un environnement anthropisé au Zimbabwe.

3076. Le laboratoire est spécialisé dans le diagnostic et la recherche sur les bactéries, en particulier intracellulaires. Le laboratoire qui est centre national de référence pour les rickettsioses depuis 1985 reçoit plus de 20 000 prélèvements humains, animaux ou d'arthropodes par an pour diagnostic de rickettsioses (par sérologie, culture et/ou biologie moléculaire). Le laboratoire a ainsi décrit plus de 100 nouvelles espèces bactériennes depuis les 20 dernières années, dont la majorité des nouvelles espèces de *Rickettsia* au cours de cette période.

La taxonomie est la science qui a pour objet de décrire les organismes vivants. La classification taxonomique des nouvelles espèces est actuellement fondée sur une stratégie polyphasique incluant des caractères phénotypiques (propriétés physiques, immunologiques et chimiques) et génotypiques.

Ainsi, la description taxonomique des nouvelles espèces de *Rickettsia* doit inclure une estimation de la spécificité antigénique des souches types par comparaison aux autres espèces existantes. Cette spécificité antigénique s'estime par la méthode de sérotypage croisé chez la souris.

Notre projet consiste donc à produire par culture les souches des nouvelles espèces de *Rickettsia* identifiées par biologie moléculaire et d'identifier les espèces existantes les plus proches sur le plan phylogénétique. Nous inoculerons ensuite 2 lots de 10 animaux (souris BALB/c) par la voie intra-péritonéale. Un lot sera inoculé avec la nouvelle espèce, l'autre avec l'espèce connue la plus proche. Nous comparerons ensuite la réponse sérologique des deux lots de souris contre chacun des deux antigènes par différentes techniques immunoprotéomiques (IFI, Western blot, gel 2D). Dans la mesure où le laboratoire isole en moyenne 4 nouvelles espèces de rickettsies par an, nous utiliserons 80 animaux par an, donc pour 5 ans 400 animaux.

L'expérimentation animale est incontournable puisqu'il n'est pas possible de disposer commercialement de sérums immuns spécifiques des espèces de *Rickettsia*, en particulier des nouvelles espèces. Nous utiliserons le minimum d'animaux par lot, à savoir 10, pour pouvoir étudier statistiquement les réactivités sérologiques.

Dans la mesure où les *Rickettsia* sont le plus souvent isolées de produits pathologiques humains ou animaux, les souris seront hébergées en animalerie A3 dans des cages à couvercle filtrant (5 individus par cage) avec eau et nourriture à volonté dans un environnement contrôlé (température, cycle jour/nuit). L'enrichissement sera constitué d'un dôme et de carton à grignoter.

3077. L'épidémie de l'obésité dans le monde occidental est accompagnée par une constante augmentation de la prévalence du diabète de type II – pathologie non transmissible qui concerne selon la Fédération Internationale du diabète 370 millions de personnes. La gravité du diabète est due aux complications qu'entraîne l'exposition à une hyperglycémie chronique. Parmi ces complications figurent la néphropathie et la cardiopathie diabétique. Ces pathologies entraînent une diminution de l'espérance de vie des patients et réduit leur qualité de vie. Les mécanismes de ces pathologies ne sont pas encore parfaitement compris et malgré les progrès en matière de prévention et de prise en charge du diabète, un besoin thérapeutique considérable persiste.

Le traitement médical de l'obésité fait appel à plusieurs méthodes : restriction calorique, modification du comportement, médication. Toutes sont à court terme efficaces mais les résultats à long terme sont presque toujours décevants. En revanche il est maintenant démontré, que le traitement chirurgical donne de meilleurs résultats non seulement pour la perte de poids et son maintien à long terme mais aussi pour l'amélioration ou la rémission des pathologies associées ainsi que l'amélioration de la qualité et de l'espérance de vie ce qui explique le développement de la chirurgie bariatrique au cours des 20 dernières années.

Actuellement il n'y a pas d'étude qui explore l'effet de la perte de poids massive et constante provoquée par la chirurgie bariatrique sur l'évolution de la néphropathie du diabète de type II ni chez l'homme ni sur des modèles animaux.

Le but du projet actuel est de tester l'effet de la chirurgie bariatrique sur la progression de la néphropathie et de la cardiopathie diabétique chez le rat obèse et diabétique.

L'étude des atteintes cardiaques et rénales du diabète nécessite un modèle in vivo avec un suivi à long terme ce que ne permettent pas des modèles in vitro. C'est pourquoi, les expériences seront menées sur des rats mâles Wistar. Le nombre d'animaux (112) est limité au maximum au vu de la durée de suivi d'animaux fragiles (diabète) et des anomalies cardiaques et rénales attendues. L'ensemble des manipulations animales (hébergement, soins, méthodes utilisées) sera réalisé de façon à limiter au maximum la douleur, souffrance, angoisse de l'animal. Il n'existe pas de modèle in vitro de néphropathie et de cardiopathie diabétique.

3078. La maladie artérielle périphérique (MAP) représente un problème majeur de santé publique dans les pays développés. Malgré les progrès réalisés dans la prévention des facteurs de risque (tabac, diabète, obésité...) et dans les techniques interventionnelles et chirurgicales (pontage, stents...) pour améliorer la perfusion des membres inférieurs, une partie importante des patients atteints sont considérés comme « non répondeur » pour la revascularisation, et ont un pronostic particulièrement défavorable avec des taux élevés de mortalité et d'amputation des membres. En conséquence, l'identification de nouvelles approches thérapeutiques (ici le XO) pour traiter cette complication invalidante est d'un intérêt critique. Afin d'évaluer le comportement du XO chez l'animal, il semble intéressant de travailler avec de l'imagerie fonctionnelle telle que la tomographie par émission de positons (TEP), de par entre autre le caractère non invasif de cette technique. Notre attention va ici se porter sur le marquage du XO par un élément radioactif permettant son suivi in vivo par imagerie TEP.

L'étude proposée s'attèle à réaliser le radiomarquage du XO et à tester ce nouveau radiomarqueur sur 96 souris male balb/c afin de prouver son implication dans l'angiogenèse et dans la revascularisation post ischémique, laissant entrevoir par la suite les possibles propriétés curatives de cette molécule.

Les animaux seront hébergés dans des cages dédiées avec alimentation et eau ad libitum et avec un enrichissement adapté (nids et copeaux). La surveillance de l'absence d'atteinte de point limite (voir 3.4.13) sera réalisée également. Concernant les expérimentations, si nous observons un comportement de souffrance suite aux interventions, un antalgique (paracétamol 200mg/kg VO) sera administré.

Pendant l'examen, l'animal est anesthésié et la respiration est suivie. L'animal est réchauffé par une table ou couverture chauffante ce qui permet de maintenir sa température interne et de lutter contre l'hypothermie due à l'anesthésie.

Le radiotracer lui-même ne devrait pas avoir d'effets pharmacologiques étant donné qu'il est injecté à une très faible dose (le but étant de cibler le récepteur et non d'induire un effet pharmacologique). Il sera injecté par voie intraveineuse après anesthésie de l'animal par Isoflurane 1.5%, le volume injecté est de 0.1mL.

Le nombre d'animaux examinés (12 animaux pour l'imagerie et 6 pour chaque groupe d'immunohistochimie) est suffisant pour mettre en évidence une corrélation existe entre les imageries par  $\mu$ TEP/CT et la quantification immunohistochimique.

3079. Le cancer de la peau est un véritable enjeu de santé publique. Il se situe au 11e rang des cancers les plus fréquents et on observe une hausse continue du nombre de nouveaux cas depuis 40 ans parmi les populations blanches de différents pays. On estime que le nombre de nouveaux cas dans le monde devrait encore doubler d'ici à ces 20 prochaines années, l'exposition aux rayonnements UV (soleil, cabines de bronzage) étant le principal facteur de risque de ce cancer. Il est donc primordial de développer des technologies efficaces pour détecter ce cancer de la façon la plus sûre et la plus précoce.

Un système optique a été développé pour la mise en évidence de variations, en temps réel et de façon non invasive, de la nature des composants de la peau en relation avec des pathologies cutanées telles que les cancers de la peau ou des pathologies inflammatoires telles que le psoriasis.

Le système se place au-dessus de la peau sans contact et collecte des spectres caractéristiques des entités moléculaires présentes sur le site mesuré.

Ce projet mettra en œuvre le système prototype sur un modèle rongeur et nécessitera l'utilisation de 4 animaux.

A ce stade du projet, l'objectif de cette expérience est d'évaluer l'efficacité de ce système optique pour mettre en évidence des différences dans la nature des composants de la peau (graisse, mélanine...) en dehors de tout contexte pathologique. Si cette démonstration est acquise chez l'animal, la suite de l'étude se poursuivra directement chez l'homme.

Remplacement : Le système d'imagerie a été caractérisé sur des objets inertes dits « fantômes » mimant les caractéristiques de la peau. Il est maintenant indispensable de réaliser une étape de validation finale sur de la peau d'animaux vivants avant d'envisager les essais chez l'homme.

Réduction : L'étude a pour but de fournir une preuve de concept de faisabilité. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, les bicolores sont privilégiés pour disposer sur le même animal de fragments de peaux blancs et noirs. Le nombre d'animaux utilisés permettra d'obtenir une variabilité de mesures entre les individus (pigmentation de la peau, densité de vascularisation, épaisseur de la couche grasseuse sous cutanée).

Raffinement : Les animaux sont hébergés en groupe sociaux dans un milieu enrichi avec des tunnels en carton et morceaux de papier pour y faire un nid.

Les mesures sont non invasives et totalement indolores. Pour éviter un stress lié à une contention permettant d'effectuer l'examen optique, une anesthésie gazeuse est pratiquée sur l'animal tout au long de la procédure. Pendant l'examen, l'animal est placé sur coussin chauffant afin de garantir sa thermorégulation. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe par le personnel en charge de leurs soins, garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

3080. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la recherche sur le diabète, pathologie qui se caractérise par une élévation anormale du taux de glucose dans le sang, et qui touche plus de 300 millions de personnes dans le monde, soit 6,6 % de la population adulte mondiale, d'après la Fédération Internationale du diabète. 4 millions de personnes sont mortes, des suites du diabète en 2010, soit 6,8 % de la mortalité mondiale. Il est donc crucial de développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Ce projet de recherche implique plusieurs lignées de souris mutées pour des gènes potentiellement importants pour la sécrétion d'insuline, et leur lignée contrôle (WT). Les souris seront soumises à plusieurs régimes alimentaires différents afin de provoquer une obésité et un diabète de type 2. Les mutations concernent des gènes du métabolisme des lipides, pour trois d'entre elles : Elov12 (elongase of very long chain fatty acid, type2), SPT2 (serine palmitoyl transferase 2), SPHK1 (sphingosine kinase 1). Il s'agit d'une délétion conditionnelle du gène (souris "floxées") : le gène sera délété en présence d'une protéine "recombinase Cre", ce que nous obtiendrons par croisement avec des souris exprimant cette protéine. Comme nous nous intéressons à la cellule beta pancréatique, productrice d'insuline, nous croiserons ces souris avec d'autres souris exprimant la protéine Cre sous contrôle du promoteur "Insuline", spécifique de la cellule beta. Nous nous intéresserons également à autre lignée de souris mutée pour le gène de l' ApoM (Apolipoprotéine M), ce gène étant potentiellement impliqué dans le métabolisme des lipides et plus largement dans le maintien de l'homéostasie énergétique. Nous pourrions alors tester l'implication des protéines codées par ces gènes dans les modulations de la sécrétion d'insuline qui surviennent au cours de l'étiologie du diabète de type 2 (d'abord hypersécrétion pendant le pré-diabète, car les organes périphériques présentent une résistance à l'insuline, puis effondrement de la sécrétion d'insuline et apparition du diabète). Ces expériences permettront également de mettre en évidence des biomarqueurs (substances circulantes dans le plasma) quantitativement corrélés à la sensibilité à l'insuline ou à la capacité sécrétoire du pancréas, et qui, si cela se vérifie également chez l'Homme, permettraient de prédire le déclenchement du diabète, pour mettre en œuvre plus tôt des mesures prophylactiques.

Cette étude ne peut être remplacée par d'autres moyens car l'étude d'un dialogue inter-organes ne peut se faire qu'in vivo, et les souris sont un excellent modèle d'étude de l'homéostasie glucidique (physiologie et pathophysiologie très similaires à l'Homme). Cette étude utilisera le minimum de souris nécessaire et respectera le plus possible le bien-être animal (règle des 3R, raffinement des procédures et amélioration de leur environnement). Au cours de cette étude 920 souris (*mus musculus*) seront utilisées.

3081. Le cancer figure parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde, avec une incidence qui n'a cessé de croître depuis 1980. En 2012, l'Organisation Mondiale de la Santé (« OMS ») a recensé 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie. En cancérologie, les traitements sont actuellement dominés par la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Depuis quelques années, des recherches sont entreprises afin de développer des approches thérapeutiques plus ciblées, présentant l'avantage d'être plus efficaces et moins toxiques.

Parmi les différentes pistes thérapeutiques envisagées, une société de biotechnologie tente d'évaluer l'activité tumorigène des interleukines dans les mélanomes, les fibrosarcomes, et les cancers mammaires, colorectaux et pancréatiques. Les interleukines sont des cytokines produites mais aussi utilisées par le système immunitaire, servant de messagers entre les cellules du système immunitaire, notamment de médiateur dans les interactions locales entre les leucocytes (globules blancs). Différentes fonctions ont été rapportées pour les interleukines dont un rôle dans les maladies auto-immunes et inflammatoires, mais également dans le développement tumoral.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux contre les cytokines IL-17. Ces protéines ont émergé depuis quelques années comme étant impliquées dans différents cancers dont ceux du sein et du colon. La finalité de ce projet consiste à déterminer si le ciblage de cette protéine avec un anticorps monoclonal bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter la protéine d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour sous exprimer cette molécule, afin de permettre la production, par des lymphocytes B, d'anticorps contre cette molécule qui est reconnue dans ce modèle murin comme du « non-soi ».

Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate de souris immunisées, seront fusionnés à une cellule immortelle de myélome murin, afin de générer une cellule hybride, nommée hybridome, capable de proliférer indéfiniment et de produire in vitro des anticorps. Chaque hybridome produira uniquement l'anticorps monoclonal synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes générant des anticorps spécifiques d'un déterminant antigénique (épitope). L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 16 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Le temps d'immunisation des souris sera de 4 mois.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modéré. La procédure peut engendrer de la fièvre chez l'animal, dans les 24 heures suivant l'immunisation. Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les souris sont hébergées dans des cages adaptées, proposant des objets d'enrichissement (abri, coton pour fabrication de nid) permettant de stimuler l'activité des animaux et de maintenir leur sociabilisation.

3082. L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la troisième cause de mortalité dans les pays industrialisés. Il se caractérise par une défaillance de la circulation sanguine qui affecte une région plus ou moins importante du cerveau. L'AVC survient suite à la formation d'un thrombus (caillot) qui obstrue un vaisseau sanguin provoquant la mort des cellules nerveuses par privation d'oxygène et d'éléments nutritifs essentiels à leurs fonctions. Aucun traitement n'est actuellement satisfaisant pour rétablir la perfusion du cerveau sans risque hémorragique. Il est donc urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces et sûres pour le traitement de l'AVC. Des essais in vivo sur la souris ont montré que l'utilisation d'un anticorps spécifique à action ciblée dans l'organisme pourrait constituer un réactif capable d'inhiber la formation du caillot et son extension dans les premiers stades de l'AVC.

Dans cette optique et pour assurer une sécurité suffisante autour de l'usage d'une nouvelle molécule chez l'Homme, des tests in vivo chez l'animal doivent être obligatoirement menés. Ces derniers sont à l'heure actuelle indispensables pour compléter les données obtenues in vitro. Dans ce projet, l'utilisation du modèle primate est privilégiée et se justifie par les spécificités des molécules à étudier. En effet, il existe une grande proximité phylogénétique entre le Primate Non Humain (PNH) et l'Homme. Il est donc légitime de penser que les résultats observés chez eux seront transposables à ceux qui pourront être observés chez l'Homme.

Ce projet sera divisé en trois procédures. La procédure 1 permettra d'obtenir des données comparatives préliminaires avec une molécule de référence habituellement utilisée chez l'Homme comme anti-agrégant plaquettaire (comparaison avant/après traitement). La procédure 2 consistera à évaluer parmi quatre doses du nouveau candidat médicament, les deux plus efficaces. Les données de cette deuxième procédure pourront être comparées avec celles de la première procédure pour vérifier l'absence d'effet hémorragique qui est un des intérêts de la nouvelle molécule. La procédure 3 utilisera deux doses sélectionnées à la procédure 2 pour affiner la dose optimale chez l'Homme. Des prélèvements sanguins de faible volume seront effectués afin de suivre l'évolution et l'efficacité du traitement.

Pour ce projet, déposé pour une durée de 5 ans, il est prévu d'utiliser au maximum 40 macaques cynomolgus issus d'un élevage agréé. Dans un souci de réduction, le nombre d'animaux utilisés, soit 40 animaux sur 5 ans, a été réduit au minimum nécessaire à l'obtention de résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Dès leur arrivée et entre chaque procédure, les animaux seront examinés par un vétérinaire, pour s'assurer de leur bon état de santé. Ils seront suivis individuellement et quotidiennement afin de détecter tout signe clinique de douleur ou de détresse. Des périodes de récupération suffisantes seront accordées aux animaux entre chaque administration et chaque procédure. Une attention particulière sera accordée à l'enrichissement du milieu de vie des animaux. Le personnel veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress pouvant être engendré par les manipulations.

3083. L'hypodynamie-hypokinésie (HH) est définie comme une diminution de la charge exercée sur les muscles posturaux (hypodynamie) et de l'activité motrice (hypokinésie). Cette situation est rencontrée dans les pathologies nécessitant un alitement ou une immobilisation prolongée. L'HH entraîne une altération des performances motrices (posture et marche), et peut donc être à l'origine d'une perte d'autonomie. Les modifications physiologiques au cours d'une période d'HH sont d'ailleurs similaires à celles observées lors du vieillissement. Leur étude présente donc un intérêt majeur afin de maintenir une bonne qualité de vie chez le patient alité comme lors du vieillissement.

L'origine des altérations de la performance motrice après HH est multifactorielle, et inclut à la fois des phénomènes périphériques (atrophie musculaire et perte de force) et centraux (plasticité du cortex sensorimoteur, modification de l'excitabilité corticale). Si les adaptations musculaires qui surviennent suite à une période d'HH sont bien documentées, il y a en revanche peu de données sur le cortex sensorimoteur.

L'une des hypothèses pouvant rendre compte d'un changement d'excitabilité des neurones corticaux concerne le rôle de différentes protéines transmembranaires : les canaux ioniques. En particulier, les canaux potassiques (Kv4.2, KCa) sont connus pour participer au contrôle de l'excitabilité neuronale. Enfin, l'insulin like growth factor 1 (IGF-1) est une neurotrophine, qui a chez l'adulte un rôle de modulateur de l'activité cérébrale, et notamment de l'excitabilité cellulaire, par son action sur des canaux ioniques. Or, il a démontré récemment que les taux d'IGF-1 étaient diminués dans le cortex sensorimoteur de rats soumis à l'HH.

L'objectif de ce projet est donc de caractériser, chez le rat soumis à une période d'hypodynamie-hypokinésie, les éventuelles modifications d'expression et de fonctionnalité de différents canaux ioniques et de décrire les voies de signalisation impliquées.

Actuellement, la plupart des techniques de réhabilitation pour les patients immobilisés portent sur le renforcement musculaire (électrostimulation...). Cependant, les stratégies de réhabilitation seront plus efficaces en prenant en compte la commande centrale. Ainsi, une meilleure connaissance des phénomènes plastiques, ainsi qu'une compréhension des effets de l'IGF-1 au niveau cérébral, pourraient nous amener, dans le futur, à développer des stratégies thérapeutiques pour prévenir l'altération de la performance motrice ou permettre une meilleure récupération chez des patients ayant subi un alitement prolongé.

Nous estimons le nombre d'animaux nécessaires pour cette étude à environ 140 rats mâles. En effet, il n'existe pas à l'heure actuelle de conditions de cultures cellulaires satisfaisantes mimant les conditions d'HH. Toutefois, nous surveillons régulièrement le développement d'un tel modèle afin de limiter l'utilisation des animaux au cours de notre projet de recherche. Dans un souci de réduire les contraintes sur les animaux, nous serons particulièrement attentifs au nombre d'animaux par cage et nous utiliserons également des éléments afin d'enrichir le milieu des animaux.

3084. Le choc septique correspond à une infection grave ayant un retentissement sur l'ensemble de l'organisme et mettant en jeu le pronostic vital avec un taux de mortalité élevé. L'amélioration de sa prise en charge est donc un enjeu majeur. Les mécanismes de la progression d'une infection localisée, parfois banale, au choc septique puis au décès restent mal connus. Le choc septique est caractérisé par une défaillance cardiocirculatoire avec une hypotension artérielle, ne répondant pas au remplissage vasculaire et nécessitant un traitement par amines vaso-actives. La contractilité cardiaque peut être altérée, aggravant la défaillance circulatoire. L'hyperstimulation du système adrénergique joue probablement un rôle important dans cette dysfonction myocardique. Le blocage des récepteurs bêta1-adrénergique par bêta1-bloquants pourrait prévenir cette cardiopathie liée au sepsis.

L'objectif principal de notre étude est d'évaluer l'intérêt d'un traitement par bêtabloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours du sepsis, chez des rats mâles (n=30) et femelles (n=30). La fonction cardiaque sera évaluée en utilisant l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM), permettant ainsi une analyse dans les conditions réelles. L'objectif secondaire est de clarifier le métabolisme énergétique en analysant la consommation en oxygène au niveau des cellules cardiaques. Grâce à cette étude, nous espérons montrer un bénéfice à l'utilisation d'un bêtabloquant pour améliorer la fonction cardiaque au cours des infections graves. La contractilité cardiaque des rats traités par landiolol serait mieux préservée par rapport au groupe contrôle. Le bénéfice attendu serait plus important chez les mâles du fait d'une altération plus importante de leur contractilité cardiaque par le sepsis. Le but à long terme est de pouvoir utiliser ce traitement chez l'Homme pour améliorer leur prise en charge et donc leur devenir.

Les dommages prévisibles pour les animaux sont l'induction d'un sepsis dont l'évolution naturelle est la défaillance multiviscérale puis le décès des rats en quelques jours. L'euthanasie des rats à la 24<sup>ème</sup> heure dans les conditions réglementaires évite la souffrance et la douleur engendrée par cette évolution naturelle. L'espèce choisie est le rat car elle possède des caractéristiques hémodynamiques et métaboliques proches de l'Homme durant le choc septique. Notre approche expérimentale permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. Grâce à l'IRM, nous pouvons évaluer les fonctions cardiaques sans sacrifice et ainsi pouvoir par la suite étudier le métabolisme énergétique sur les mêmes animaux. L'impact environnemental est pris en compte par une phase d'acclimatation des animaux de quelques jours. Les conditions d'hébergement visent à leur apporter le maximum de bien-être et à satisfaire leurs besoins physiologiques. Les conditions de températures, lumière et humidité des cages sont contrôlées. L'eau et la nourriture sont mises à disposition en qualité et en quantité satisfaisantes. Une personne est chargée du bien-être des animaux. La douleur est limitée par une anesthésie inhalée associée à un morphinique pour les actes douloureux (cathéter veineux, ligature-ponction caecale). L'anxiété liée à la réalisation de l'IRM est limitée par une anesthésie inhalée. La température corporelle sera maintenue à 37°C pendant l'examen grâce à une couverture chauffante. L'euthanasie à la 24<sup>ème</sup> heure se fera sous barbituriques. Ceci permet également de limiter les souffrances engendrées par l'évolution du sepsis.

3085. L'infection par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) touche 34 millions de personnes dans le monde et est considérée comme un problème de santé publique majeure. Afin de lutter contre cette épidémie, différentes approches thérapeutiques ont été développées. Bien que non curatifs, les traitements combinant différents antirétroviraux ont un impact positif sur la mortalité et la morbidité chez les patients porteurs du VIH. Cependant, l'utilisation prolongée de ces traitements semble conduire à un vieillissement accéléré des patients. En effet, ces patients développent des anomalies métaboliques et morphologiques du patient âgé telles que des résistances à l'insuline, de l'hypertriglycéridémie, des lipodystrophies ou encore de l'ostéoporose.

Récemment, une combinaison médicamenteuse contenant un aminobiphosphonate (traitement contre l'ostéoporose) et une statine (hypolipidémiant) a montré son efficacité pour atténuer certains signes cliniques associés au vieillissement prématuré des modèles murins de Progeria (maladie génétique conduisant à un vieillissement accéléré). Notre étude a pour but de montrer que cette combinaison médicamenteuse peut diminuer les effets secondaires des traitements anti rétroviraux donnés aux patients infectés par le VIH. Pour cela, nous souhaitons analyser in vivo les conséquences de ces antirétroviraux, puis rechercher les effets protecteurs potentiels de l'administration de la combinaison aminobiphosphonate-statine. Pour cela, nous avons choisi d'étudier un modèle murin. L'étude sera réalisée sur 60 souris mâles de type CH3 âgés de 8 semaines. Ces souris seront réparties en 4 groupes de 15 animaux: souris contrôles, souris traitées par les antirétroviraux, souris traitées par la combinaison aminobiphosphonate-statine, souris traitées par les antirétroviraux et la combinaison aminobiphosphonate-statine. Les études seront réalisées de manière séquentielle. Dans un premier temps, nous étudierons le lot contrôle et le lot traité par les anti-rétroviraux. Si les analyses (biochimie sanguine, histologie, imagerie...) sont concluantes et mettent en évidence des conséquences biologiques de ces traitements, nous étudierons les deux autres lots.

L'ensemble du protocole nécessite ce nombre d'animaux pour atteindre une puissance statistique suffisante tout en respectant les impératifs de réduction.

Par ailleurs, afin de se rapprocher des conditions de la prise du médicament chez les patients, les traitements seront administrés par voie orale, une fois par jour, pendant 2 mois. Les doses des différentes molécules ont été établies en se basant sur les doses données chez l'homme et en utilisant les calculs de BSA (Body Surface Area) définis par Reagan-Shaw. Pour l'ensemble des molécules testées, les doses obtenues par ces calculs sont cohérentes avec les doses utilisées dans la littérature et inférieures aux doses toxiques chez la souris.

Afin de réduire le stress subi par les animaux et de respecter leur instinct grégaire, les souris seront stabulées à 3-4 par cages dans un milieu enrichi par des maisonnettes en carton.

A l'issue du traitement, administré par voie orale (per os), une fois par jour, pendant 2 mois, nous utiliserons de l'imagerie non invasive par rayons X (DEXA scan) pour analyser la composition corporelle (pourcentage de masse grasseuse et densitométrie osseuse). Les animaux seront mis à morts et leurs organes seront prélevés afin de réaliser des analyses histologiques, transcriptomique et protéomiques. Une analyse biochimique complète des paramètres sanguins sera également réalisée.

Des résultats concluants de cette étude permettraient d'améliorer la qualité de vie de patients porteurs du VIH traités par une combinaison d'antirétroviraux.

3086. Avec une incidence de 2400 nouveaux cas par an en France, les tumeurs cérébrales les plus agressives (glioblastome) sont la 3ème cause de décès par cancer chez l'adulte. Le traitement de référence consiste, lorsque cela est possible, à retirer chirurgicalement la tumeur, puis à traiter par radiothérapie et chimiothérapie. Cependant dans certains cas, ces tumeurs ne sont ni opérables, ni contrôlables par les thérapies classiques. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles approches thérapeutiques.

La finalité clinique de notre recherche est de proposer une nouvelle thérapie non invasive : la thérapie photodynamique interstitielle. La thérapie photodynamique est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses.

Cependant la thérapie photodynamique a besoin d'oxygène pour être efficace et la concentration en oxygène dans les tumeurs est très faible. De plus la distribution au sein de la tumeur de l'agent photosensibilisant doit être optimale. Ainsi, nous travaillons à l'étude de l'utilisation de médicaments améliorant la distribution de l'agent photosensibilisant ainsi que l'oxygénation tumorale lors du traitement par thérapie photodynamique pour optimiser les effets anti-cancéreux.

Néanmoins, le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas encore possible dans le domaine de l'oncologie. En effet, le développement d'une tumeur et de sa vascularisation sont des mécanismes complexes impliquant l'interaction entre de nombreux types cellulaires (cellules tumorales, endothéliales, stromales) et nombreux composants matriciels (collagène, fibronectine, protéoglycanes, etc), qui, pour être modélisés sur de réelles bases physiologiques et structurales, nous obligent de réaliser ces études chez l'animal.

Des tumeurs cérébrales d'origine humaine seront implantées en sous cutané chez toutes les souris nude utilisées dans ce projet. Les souris seront ensuite traitées ou non par différentes combinaisons de traitement anti-cancéreux. Plusieurs paramètres seront étudiés pour évaluer les effets des différents protocoles:

- Le suivi de la vascularisation des tumeurs sera réalisé grâce à la mise en place de chambres dorsales sur le dos des souris permettant ainsi par des techniques d'imagerie non invasive de réduire les souffrances de l'animal (Raffinement) et le nombre d'animaux (Réduction) en réalisant des images et des films de la vascularisation tumorale dans le temps sur un même animal.

Les images obtenues permettent après traitement mathématique d'obtenir différents paramètres et de modéliser la réponse thérapeutique du réseau vasculaire tumoral.

- La mesure du flux sanguin et de l'oxygénation par un système de sondes positionnées au sein de la tumeur.
- Le suivi de croissance des tumeurs par mesure du volume tumoral.

Cette étude préclinique nécessitera au maximum 244 souris. Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de séries consécutives afin d'ajuster le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés (Réduction). En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des animaux fera l'objet d'un suivi quotidien, les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur, mise en place de chambre dorsale, imagerie, traitement par thérapie photodynamique). Les animaux sont mis à mort dès que l'un des points suivant est atteint (Raffinement):

- qu'ils présentent un des signes de souffrance (amaigrissement avec perte de poids > 10 -15% pendant plus de 3 jours, troubles de la motricité, isolement, dos voûté) ;
- que la tumeur atteint un volume supérieur à 1500 mm<sup>3</sup> ;
- que la chambre dorsale n'est plus adaptée à l'observation du réseau vasculaire tumoral.

3087. Le rôle de la flore intestinale sur la santé de l'homme est maintenant largement reconnu. La flore intestinale est composée de nombreuses bactéries (appartenant au moins à 800 espèces différentes) qui participent à la dégradation des aliments (ex : fermentation des fibres alimentaires), permettent la synthèse de vitamines (ex : vitamine K) ou encore protègent contre les infections par d'autres bactéries virulentes qui provoqueraient des maladies intestinales. La composition de la flore intestinale est importante car celle-ci agit sur le développement des défenses immunitaires, produit des substances agissant sur le cerveau et jouerait un rôle dans certaines maladies inflammatoires chroniques, l'obésité ou encore le diabète et le cancer.

Dans la flore intestinale, nous étudions l'une des ces espèces bactériennes, considérée comme inoffensive, et qui s'installe dans le tube digestif des nouveau-nés dès les premières heures après la naissance puis persiste toute la vie de l'individu. De nombreuses études montrent cependant que certaines de ces bactéries produisent des substances appelées toxines dont l'impact sur notre santé reste encore inconnu. Nos études visent à comprendre leur rôle éventuel dans le développement de certaines maladies ou, au contraire, dans la protection contre ces maladies.

Ces études mettront en œuvre un modèle animal reproduisant l'installation précoce de cette bactérie dans la flore intestinale chez les nouveau-nés par administration orale de ces bactéries dans des ratons ou des mères gestantes. Les animaux ainsi colonisés sont ensuite examinés pour déterminer la localisation des bactéries dans le tube digestif, la production de toxines et leur impact sur le tissu intestinal.

La règle des 3R est respectée:

Remplacer : Nous avons au préalable fait des études en utilisant des cellules en culture permettant d'élucider comment agissent les toxines produites par la bactérie étudiée. Cependant, le recours à l'animal est irremplaçable car aucun autre modèle ou tube à essai ne permet d'évaluer, au niveau d'un individu, les répercussions de cette bactérie au sein de la flore intestinale et de ses toxines sur la santé.

Réduire : le nombre rates utilisées est de 93 femelles gestantes. Plusieurs paramètres seront analysés sur le même animal (poids, nombre de bactérie, prélèvements de fèces, de tissus et de sang lors du sacrifice) pour réduire le nombre d'animaux nécessaires.

Raffiner : Certaines souches virulentes des bactéries étudiées peuvent provoquer des infections généralisées chez le jeune raton. Pour ces souches spécifiquement, le temps d'expérimentation sera donc réduit afin de minimiser la mortalité des ratons. Chez l'animal adulte, une perte de poids (non attendue) supérieure à 20 % du poids initial nous conduira à sortir l'animal du protocole expérimental et à l'euthanasier.

3088. Le présent projet vise à déterminer le rôle des acides gras à chaîne courte (AGCC) (modulés à la fois chez les obèses mais aussi lors de l'ingestion de fibres), sur le dialogue métabolique entre tissus et organes et le développement de l'insulino-résistance (IR). Des données récentes de la littérature suggèrent en effet un rôle signal majeur de ces molécules dans le maintien de l'homéostasie énergétique de l'organisme qui pourrait expliquer le rôle bénéfique connu mais mal expliqué des fibres alimentaires dans la lutte contre l'IR et le diabète. Ceci est l'objectif cognitif du projet. Les fibres étant apportées dans des aliments complets, mais en quantité insuffisante dans l'alimentation humaine occidentale, l'objectif plus 'appliqué' du projet est de développer un produit 'pain' enrichi en fibres et présentant des caractéristiques rhéologiques et gustatives acceptables par le consommateur et bénéfique pour leur santé. Ce projet, de physiologie intégrative (interactions entre tissus et organes pour l'utilisation des nutriments) ne peut être réalisé que sur des organismes intègres et in vivo. Aucune méthode in vitro ne permet de mettre ainsi en évidence et de quantifier les échanges de flux de nutriments entre tissus et organes.

Le fait que l'étude consiste en des mesures répétées sur les mêmes animaux (pour étudier l'évolution de l'IR chez les animaux) permet de limiter la variabilité individuelle et de limiter le nombre d'animaux expérimentaux (14 truies yucatan adultes (1 an) fonctionnelles dans cette étude, c'est-à-dire de 17 animaux maximum utilisés in fine dans l'éventualité où 3 des animaux opérés présentent un des cathéters non fonctionnels au cours de l'étude, ce qui les rend inutilisables pour l'étude nécessitant l'ensemble des cathéters fonctionnels). Ce type d'approche permet donc de réduire le nombre d'animaux tout en augmentant la puissance statistique de l'étude.

Pour réaliser des prélèvements sanguins répétés dans le temps dans divers sites de l'organisme, l'utilisation d'animaux cathétérisés est indispensable. Du personnel formé à ces modèles animaux (chirurgien, personnel technique et scientifique

dédié) est présent sur site. L'ensemble du personnel (chirurgiens, animaliers et expérimentateurs) est très sensibilisé aux techniques de prise en charge de la douleur en période post opératoire et à l'observation des animaux permettant de détecter les signes d'inconfort des animaux, en particulier dans la période post-opératoire.

3089. Le système immunitaire adaptatif dépositaire de la mémoire immunologique est responsable de la protection induite par les vaccins. Il comporte deux bras : la réponse humorale médiée par les anticorps et la réponse cellulaire cytotoxique médiée par les lymphocytes T CD8. Pour savoir laquelle de ces composantes est essentielle à la protection contre un virus, la technique privilégiée est de transférer d'un animal immunisé/protégé vers un animal naïf, soit les anticorps, soit les lymphocytes T CD8, puis d'infecter cet animal avec le virus et d'observer quel transfert (anticorps ou lymphocytes T CD8) le protège des symptômes.

Cependant, le transfert de cellules d'un animal à un autre entraîne systématiquement un rejet des cellules étrangères injectées, à moins que le donneur et le receveur soient histocompatibles. Bien que des lignées de porcs histocompatibles (lignée D/D entre autres) aient été développées, ces lignées présentent aujourd'hui de très gros problèmes de reproduction interdisant les expérimentations sur ces animaux. L'autre solution que nous proposons de tester dans cette DAP, est de produire des couples de jumeaux par scission d'embryons. Les jumeaux provenant du même œuf sont parfaitement histocompatibles et les lymphocytes de l'un injecté à l'autre ne subiront aucun rejet.

Nous appliquerons le transfert de lymphocytes T CD8 dans une DAP associé visant à déterminer le rôle des lymphocytes T CD8 dans la protection induite par un vaccin anti-syndrome dysgénésique et respiratoire porcin (SDRP ou PRRSV en anglais), et impliquant donc le transfert de lymphocytes T CD8 d'un animal vacciné dans un animal naïf. Le virus PRRSV est généralement présent dans 60 à 80% des exploitations. Il provoque des troubles de la reproduction comme des mise-bas précoces et des avortements. En post sevrage, les principaux signes d'infection par le virus du SDRP incluent une baisse du gain de poids et l'augmentation de la prévalence d'autres maladies infectieuses endémiques due à une immunosuppression induite par le virus.

L'obtention de jumeaux demande :

- Des truies adultes, dont on provoque l'ovulation, et qui sont inséminées artificiellement. Les embryons seront collectés après euthanasie des donneuses.
- La scission in vitro des embryons afin d'obtenir des jumeaux.
- La réimplantation des embryons scissionnés (jumeaux) dans des truies adultes receveuses préalablement conditionnées.
- La gestation menée à terme des deux jumeaux.

Règle des trois R :

Remplacement : le projet portant sur la tolérance/rejet de cellules pour des expériences ultérieures de vaccination, il nous est impossible de remplacer la complexité de l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Les animaux utilisés sont des porcs qui proviennent d'élevages autorisés.

Réduction : le projet prévoit le recours à un maximum de 40 animaux (20 femelles adultes donneuses d'embryons et 20 femelles receveuses de ces mêmes embryons scindés), nous permettant de nous assurer de la reproductibilité du processus de scission, de survie et d'identification des animaux histocompatibles. Cette DAP faisant référence à une mise au point technique, chaque succès (naissance de couples de jumeaux histocompatibles) sera rentabilisé en faisant rentrer les animaux dans l'expérimentation de vaccination, de transfert de lymphocytes T CD8 et d'infection (DAP "Nouveaux vaccins contre le virus du syndrome dysgénésique et respiratoire porcin").

Raffinement : l'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur éventuel. Les animaux en post-opération ne seront pas laissés seuls et leur milieu sera enrichi avec des jouets adaptés.

3090. Ce projet a pour objectif l'étude du comportement des requins bouledogue (*Carcharhinus leucas*) et tigre (*Galeocerdo cuvier*). Il s'agit d'une étude de faisabilité à mesurer avec précision l'activité des animaux dans leur habitat naturel tout en récoltant des données sur l'environnement immédiat. Nous cherchons ainsi à tester - (i) la capacité à suivre les déplacements et les rythmes d'activité d'un requin, à l'aide d'une marque émettrice, d'une caméra et d'un accéléromètre, et - (ii) à mesurer les corrélations entre l'activité des requins suivis et les conditions environnementales mesurées. L'intérêt de cette expérience est de pouvoir suivre des animaux dans leur milieu naturel qui est pour les espèces de requins adultes la seule possibilité de les étudier. Le seul dommage possible de cette expérience est la possibilité que l'animal meurt après l'expérience (taux moyen du risque estimé à 5%) ou par noyade au moment de la capture (taux moyen du risque mesuré sur 120 captures de 1%). Le nombre d'animaux est justifié car le but est de tester le protocole et il faut donc au minimum 4 tests (2 par espèces). Le protocole est raffiné en réduisant la durée de pêche afin d'augmenter la probabilité de survie des animaux capturés, en mettant à profit l'immobilité tonique des requins pour les manipuler tout en maintenant un niveau d'oxygénation constant de l'animal, en limitant la durée de manipulation, en prenant soin de stériliser les outils chirurgicaux et de désinfecter l'incision et les appareils et en prévoyant un protocole de mise à mort rapide si nécessaire.

3091. Le peptide  $\beta$ -CN(94-123), appelé  $\beta$ -casofensine, est un peptide alimentaire à fort potentiel santé ciblant les mécanismes de défense de l'intestin. Son administration orale prévient les altérations de la barrière épithéliale intestinale induites chez le rat par un stress chronique ou par une entérite chimio-induite, ce qui permet d'envisager le développement d'aliments «Santé».



La  $\beta$ -casofensine, identifiée dans les laits fermentés, correspond à la séquence (94-123) de la  $\beta$ -caséine bovine. Cette protéine existe sous 6 variants génétiques qui diffèrent entre eux par un ou plusieurs acides aminés. Dans certains variants, ces acides aminés se situent dans notre séquence d'intérêt. Or à ce jour, seul l'effet de la forme majoritaire de la  $\beta$ -casofensine a été testée dans nos modèles. Notre projet vise à évaluer les effets sur la barrière intestinale du rat (cellules à mucus, perméabilité) des différents variants peptidiques de la  $\beta$ -casofensine. Nous déterminerons également l'impact de la forme oxydée de la  $\beta$ -casofensine et d'une matrice fermentaire expérimentale renfermant la  $\beta$ -casofensine. Pour cela, les différentes formes peptidiques et la matrice seront administrées par voie orale à de jeunes rats, modèle déjà validé pour l'étude de la  $\beta$ -casofensine. Dans le cadre d'un 2ème protocole, le pôle apical de segments intestinaux de rats adultes sera mis directement en contact avec les peptides étudiés grâce à un système ex vivo de chambres de Ussing. Cette phase nous permettra d'évaluer l'effet direct des différents variants et de la forme oxydée de la  $\beta$ -casofensine sur la perméabilité intestinale. Les données issues de ce projet seront utilisées pour la mise en œuvre de stratégies industrielles visant à produire le peptide d'intérêt dans les matrices laitières.

(Réduire) Nous avons eu recours aux statistiques afin de déterminer le nombre minimum d'animaux à utiliser pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'ensemble du plan expérimental sera réalisé grâce à six rates Wistar avec leur portée respective de 7 ratons (soit un sous total de 48 animaux). Douze rats mâles adultes seront en outre indispensables à la réalisation du 2ème protocole. Soit un total de 60 animaux.

(Raffiner) L'expérience de l'équipe sur la  $\beta$ -casofensine nous a permis de choisir au mieux l'espèce animale et la période d'administration des molécules à tester. Afin d'optimiser l'expérimentation, nous avons rédigé un protocole complet permettant de réduire au maximum la durée de l'expérience et de limiter le stress des animaux. En outre, nous avons procédé à l'enrichissement du milieu de stabulation selon les dispositions du comité BEA de l'animalerie de l'INSA-Lyon et notre plan expérimental ne génère pas de douleur.

(Remplacer) Enfin, dans le but de diminuer le nombre d'animaux utilisés, nous réaliserons des expériences complémentaires in vitro, en utilisant un modèle de cellules à mucus intestinales humaines.

3092. Dans le développement des médicaments et des produits de contraste pour le diagnostique, avant mise sur le marché, il est impératif de connaître le devenir du produit au sein de l'organisme (pharmacocinétique, effet pharmacologique...) ainsi que de l'action des systèmes biologiques de l'organisme sur le produit (métabolisme, excrétion...) afin d'évaluer la balance bénéfique/risque. Dans une démarche de sélection des meilleurs candidats, la connaissance de ces effets est essentielle afin de mesurer la toxicité potentielle des produits de recherche avant de poursuivre leurs développements et un jour être proposés à une utilisation humaine.

Les produits de contraste sont injectés chez l'Homme par voie intraveineuse et c'est pourquoi les procédures d'injection dans ce projet seront par voie intraveineuse. Le rat est le modèle le plus couramment utilisé, avec une base de connaissance de la biologie très précise ce qui en fait le modèle de prédilection pour des résultats robustes/reproductibles et transposables à l'Homme.

Ce projet fait partie d'une démarche classique et validée dans la recherche de nouveaux médicaments ou agents de contraste par une sélection en fonction de critères bien déterminés pour évaluer le rapport bénéfique/risque. Les produits testés auront subi, selon cette architecture de screening, une sélection sur des critères chimiques, physico-chimique et in vitro, assurant de ne tester chez l'animal que les produits les plus prometteurs afin de réduire au strict minimum le nombre d'expérimentation in vivo à réaliser. Les procédures expérimentales mises en œuvre au cours de ce projet seront réalisées sous anesthésie et analgésie gazeuse ou chimique. Dès que possible, les mêmes animaux serviront pour répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, toxicité, biodistribution) afin de raffiner l'expérimentation.

Nombre de rats au total : 1360 pour une durée de 5 ans

3093. Le diabète est une maladie importante chez l'Homme. Cette pathologie est amenée à se développer de plus en plus avec le vieillissement de la population et l'augmentation de l'espérance de vie humaine. Cette pathologie étant correctement traitée actuellement et l'espérance de vie des patients augmentant, les complications du diabète sont nombreuses. Ces complications peuvent toucher la rétine (rétinopathies), les reins (néphropathies) et les nerfs (neuropathies). Dans ce dernier cas, les nerfs de la sensibilité de la peau étant touchés, il peut apparaître des complications de cicatrisation de la peau suite à des blessures bénignes ou non ressenties par les patients. La cicatrisation du tissu cutané est d'autant plus longue que le niveau de diabète du patient est important. Des complications encore plus invalidantes peuvent apparaître ensuite (ulcères, nécroses pouvant nécessiter des amputations).

Il est donc important d'avoir un modèle prédictif des complications de cicatrisation cutanée développé chez l'animal diabétique.

Afin d'évaluer l'efficacité de nouvelles molécules thérapeutiques, il est indispensable de tester ces molécules dans ce modèle pour plusieurs raisons :

a) Il n'existe pas de modèle in vitro de cicatrisation cutanée en conditions de diabète pouvant remplacer complètement la peau en tant que tissu biologique vivant. Il existe cependant des modèles in vitro de migration cellulaire et sur explants de peau qui permettent d'effectuer un premier criblage d'efficacité de molécules, mais cette efficacité doit ensuite être confirmée chez l'animal diabétique.

b) Ces modèles in vitro ne permettent pas de tester des produits thérapeutiques ou des dispositifs médicaux (types pansements, hydrogels, etc...) appliqués directement sur la peau en application externe (topique).

c) L'efficacité ne pouvant être testée in vitro, des premières preuves d'efficacité in vivo doivent être apportées avant de passer au stade clinique de développement de ces molécules (tests cliniques chez l'homme).

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

A raison de 2 lots par an, ce projet de cinq ans utilisera un total de 600 souris.

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

- Remplacement des animaux d'expérience : L'utilisation des animaux en tant que modèle animal de cicatrisation cutanée ne sera utilisé qu'en dernier recours après des tests préalables de criblage et d'efficacité in vitro.

- Réduction des animaux: Le design de l'étude étant un plan d'expérience contrôlé en mesures répétées, le nombre d'animaux est réduit à 10 animaux par groupe.

- Raffinement : Evaluation de points finaux (poids, état d'hydratation, comportement de l'animal, état des lésions induites), et enrichissement du milieu dans les cages.

3094. Nous étudions des gènes impliqués dans l'agressivité et le caractère invasif des tumeurs. Nous avons montré in vitro qu'en fonction du taux d'expression de ces gènes la prolifération, les propriétés invasives ainsi que les mécanismes de réparation de l'ADN des cellules tumorales sont altérés. Nous souhaitons maintenant déterminer si l'expression de ces gènes peut réguler in vivo la croissance des tumeurs et le processus de formation de métastases ainsi qu'accroître l'hétérogénéité tumorale dans des modèles murins de greffes de tumeurs humaines sous anesthésie.

Pour cette étude, nous utiliserons des lignées cellulaires dérivées de mélanomes et de cancers bronchiques. Nous avons développé des variants de ces lignées qui expriment ou non, de façon stable ou transitoire, les gènes à étudier, afin d'évaluer leur importance dans l'agressivité tumorale et la dissémination métastatique. Ces cellules tumorales humaines seront implantées dans les souris immunodéficientes afin qu'elles ne rejettent pas les cellules humaines greffées. Après le délai nécessaire pour l'apparition de la tumeur (21 jours ou le délai nécessaire pour que la tumeur atteigne 2 cm<sup>3</sup>), les souris seront sacrifiées, disséquées et les tumeurs primitives et les poumons examinés.

Les résultats permettront de valider les gènes étudiés comme ayant un rôle dans l'agressivité et la dissémination métastatique et de les envisager comme de nouvelles cibles thérapeutiques, en oncologie.

Le recours à l'animal est indispensable pour la prise en compte de l'environnement tumoral dans le développement de la tumeur dans un organisme vivant.

Pour l'ensemble du projet nous avons réduit à 612 le nombre minimum d'animaux nécessaires afin d'obtenir des résultats statistiquement corrects en appliquant la règle des 3R (raffinement, réduction et remplacement)

Les animaux seront hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et l'éthique animale. Le bien être des animaux sera pris en compte. L'enrichissement sera prévu pour l'hébergement (igloos, papiers). Les animaux seront manipulés avec précaution durant toute la durée de l'expérience, pour réduire leur stress. Les animaux seront surveillés quotidiennement afin de repérer précocement les signes de souffrance (comportement, suivi du poids, pelage..).

3095. La polyarthrite rhumatoïde est une maladie qui touche 1% de la population mondiale, à raison de trois femmes pour un homme. Elle atteint les articulations et les zones péri-articulaires. Malgré les progrès thérapeutiques, l'inflammation des articulations persiste chez certains patients. Elle est caractérisée par un gonflement de la membrane synoviale qui prend l'aspect d'une pseudotumeur. L'administration d'un vecteur permettant de diminuer la masse tumorale permettrait d'améliorer la condition des patients. Nous avons identifié une nouvelle voie thérapeutique plausible que nous testons dans ce projet. Avant d'envisager une approche humaine, il convient de tester cette hypothèse en utilisant un modèle in vivo afin de confirmer les résultats antérieurs in vitro obtenus à partir de cellules synoviales issues d'arthrite humaine ou d'arthrite chez le rat Lewis. Des résultats encourageants ont été obtenus dans une expérience préliminaire in vivo avec une nécessité de confirmer ces premiers résultats.

Nous ne pouvons pas remplacer cette étape sur animaux : cette validation de concept est indispensable avant le passage à un essai clinique chez l'humain. Après la validation sur des cellules ex vivo, l'étape in vivo est une étape incontournable entre l'étude cellulaire déjà réalisée et l'étude clinique. Le nombre de 7 animaux par groupe est un minimum pour obtenir des résultats significatifs (données issues des études antérieures et à des analyses rétrospectives). Le design de l'étude a été une longue discussion entre les différentes personnes impliquées dans le projet afin de réduire au maximum le nombre de groupes et le nombre d'animaux par groupe tout en garantissant une analyse : cette expérience nécessitera 14 rates.

Enfin, nous raffinerons les étapes de l'expérimentation : les injections seront réalisées sous anesthésie gazeuse, le suivi clinique quotidien de chaque animal sera réalisé grâce à des indicateurs systémiques et locaux reconnus dans l'arthrite et plusieurs points limites ont été mis en place ainsi que des actions d'améliorations appropriés pour chacun d'eux.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes sociaux harmonieux; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" (à une hauteur adaptée au modèle) et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

3096. Les glioblastomes sont les tumeurs du cerveau les plus agressives avec un pronostic très sombre : le temps moyen de survie des patients atteints d'un glioblastome est généralement d'environ 16 mois après diagnostic. Malgré les avancées dans les thérapies actuellement utilisées (chirurgie permettant de retirer la tumeur, chimiothérapie et radiothérapie), les patients

atteints de glioblastomes ont un faible taux de survie et les traitements finissent au bout d'un certain temps par ne plus être efficace sur la tumeur et donc de causer le décès du patient. Ainsi, il est nécessaire de trouver de nouveaux traitements ou des traitements plus efficaces.

Nous proposons d'utiliser un nouveau type de médicament qui a un mode d'action différent de celui des traitements actuels. Ce traitement appelé siTSP1 va permettre de bloquer l'action d'une molécule, la Thrombospondine 1, qui a été montrée dans de nombreuses études comme nécessaire à la croissance de la tumeur et à la résistance aux traitements actuels, notamment en contrôlant le nombre de vaisseaux sanguins, et à la formation des métastases. Cette molécule représente aujourd'hui une stratégie prometteuse pour le traitement du cancer. De plus, ce médicament est délivré directement dans le cerveau et y reste confiné, ce qui permet de ne pas léser le reste du corps et donc de diminuer les effets secondaires comparés aux traitements classiques.

Ce projet a pour objectif final de tester l'efficacité de cette molécule dans le but de :

- Augmenter le nombre des vaisseaux sanguins ce qui permettrait une meilleure oxygénation de la tumeur, la rendant ainsi moins agressive et plus réceptive aux traitements actuels.
- Fortement diminuer la migration des cellules tumorales responsables des métastases locales qui sont la cause majoritaire des décès
- Essayer de combiner les traitements actuels avec le siTSP1 pour améliorer leurs efficacités et diminuer les résistances observées.

- Augmenter la survie et/ou permettre l'éradication totale de la tumeur.

L'étude de l'efficacité et la compréhension des mécanismes de ce traitement thérapeutique n'est réalisable que sur un organisme entier. Car les cellules en culture ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs ni la difficulté pour une molécule d'atteindre les cellules cibles. D'où l'utilisation indispensable de souris pour ce projet permettant de s'affranchir de ces limitations et d'être plus représentatif de ce qui se passe en réalité.

Ce projet devra être réalisé 3 fois sur 5 ans soit un nombre total d'animaux de 240 souris pour obtenir des valeurs d'efficacité statistiques permettant le développement clinique de cette molécule.

La démarche de traiter via une administration continue sous-cutanée permettra de s'affranchir d'une injection quotidienne chez les animaux (améliorant ainsi leur bien-être selon la règle des 3 R - Raffiner). Un analgésique est administré en post opératoire.

Afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement de type Nestlet (carré de coton) sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire leur nidification. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours y compris le weekend end où le personnel de la zootechnie viendra s'assurer du bien-être des animaux. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

3097. Ces dernières années, une nouvelle classe de traitements des cancers a été développée visant à inhiber la formation des vaisseaux sanguins dans une tumeur, dans le but de créer un manque d'oxygène qui a pour but final d'asphyxier la tumeur et donc conduire à la destruction des cellules tumorales. Les résultats de ces nouvelles molécules en termes d'amélioration de la survie des patients ont été très en deçà des espérances. Il est apparu que, contrairement à ce qui était annoncé, les tumeurs développent assez rapidement différents mécanismes de résistance contre ces agents.

Ceci nous a conduits à étudier le rôle d'une protéine exprimée par de nombreux types cellulaires normaux et tumoraux. Son expression est corrélée avec une augmentation de la dissémination métastatique. De ce fait, nous souhaitons inhiber cette protéine afin d'éviter la formation de métastases, les métastases étant la cause majeure de décès par cancers.

Nous souhaitons regarder si notre molécule permet bien d'empêcher les métastases. Pour cela, il est nécessaire pour mieux connaître l'action de notre molécule de l'administrer chez des souris. Il y a eu une étude en amont sur des cultures cellulaires mais celles-ci ne permettent pas de mimer ce qu'il se passe réellement dans un organisme entier.

Nous regarderons aussi si il existe des effets additifs/ synergiques entre l'effet d'un médicament chimiothérapeutique déjà commercialisé et la molécule que nous proposons qui permet elle-même d'éviter les métastases.

Pour cela, le nombre de souris Balb/c totales nécessaires à cette étude est de 80 souris au total à raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), donc 8 groupes au total. Cette procédure pourra être réalisée 3 fois sur 5 ans soit un nombre total d'animaux de 240 souris.

Lors de cette procédure nous veillerons à ce que le bien-être des animaux soit une priorité. Tout d'abord, la démarche de traiter via une administration continue sous-cutanée permettra de s'affranchir d'une injection quotidienne chez les animaux. Nous utiliserons un analgésique lors de l'implantation des pompes de type Alzet pour éviter toute douleur à l'animal.

Ensuite, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement de type Nestlet (carré de coton) sera rajouté aux animaux leur permettant ainsi de faire leur nidification.

Enfin, durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours y compris le week end où le personnel de la zootechnie viendra s'assurer du bien-être des animaux. Dans le cas où des signes cliniques pouvant indiquer une souffrance de l'animal seraient observés (Critères observés : état du pelage de l'animal, comportement, perte d'appétit, amaigrissement, déshydratation, fréquence respiratoire anormale, dilatation des pupilles et ouverture de l'œil anormales, irritation/brûlure/nécrose cutanée au point d'administration du produit), la procédure sera immédiatement stoppée.

Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

3098. La polyradiculoneuropathie inflammatoire démyélinisante chronique est une pathologie neuromusculaire hétérogène qui affecte les nerfs périphériques et entraîne des faiblesses musculaires voire des paralysies, mais n'est pas associée à des douleurs neuropathiques. Jusqu'à présent aucun biomarqueur ne permet de diagnostiquer ces pathologies. Nous avons récemment découvert que des anticorps ciblent des molécules d'adhérences impliquées dans la formation des nœuds de Ranvier qui permettent la propagation rapide des influx nerveux le long des nerfs. Notre but est de déterminer l'implication de ces anticorps dans la genèse de cette maladie inflammatoire, cela afin de démontrer que ces anticorps sont de nouveaux biomarqueurs et afin de trouver de nouvelles thérapies pour cette pathologie. Le développement de modèles animaux est donc crucial pour mettre en évidence la pathogénicité des anticorps et découvrir les mécanismes neuro-immuns complexes responsables de ces pathologies. Il n'existe pas d'alternative à l'utilisation des modèles animaux. Les biopsies de peau ou de nerf sural ne permettent pas de rendre compte des atteintes chez ces patients.

Nous proposons ici de réaliser plusieurs procédures chez le rat Lewis qui peuvent entraîner des faiblesses musculaires, mais n'attendrons pas le stade de la paralysie et ne seront pas associées à de la douleur neuropathique. Nous proposons d'utiliser 240 animaux. Etant donné que les résultats sont peu prévisibles pour certaines procédures, nous avons surestimé le nombre d'animaux nécessaires. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés au fur et à mesure de l'étude. Notamment, nous réaliserons les études électrophysiologiques et morphologiques sur les mêmes animaux afin de diminuer leur nombre.

Pour certaines procédures, les animaux devront être isolés afin d'éviter que leurs congénères ouvrent les plaies (retirent les points de sutures) ou abiment les dispositifs servant à l'injection d'anticorps. Afin d'éviter toute détresse, les animaux seront placés dans un environnement enrichi et dans des cages contenant une épaisseur suffisante de copeaux de bois afin qu'ils puissent s'y cacher. De plus, les animaux bénéficieront d'une surveillance et d'un examen clinique quotidiens.

3099. *Nippostrongylus brasiliensis* (*N. brasiliensis*) est un parasite intestinal de certains rongeurs. C'est le modèle animal de choix pour les parasitoses intestinales humaines car 1) *N. brasiliensis* infecte plus de 700 millions personnes en grande partie dans les pays en voie de développement, 2) le cycle de vie de *N. brasiliensis* est simple et donc bien connu et 3) la maladie est très similaire chez la souris et chez l'homme.

A l'aide de ce parasite, notre objectif est de comprendre la physiopathologie des parasitoses intestinales et notamment le rôle de canaux calciques dans la mise en place de la réponse immunitaire.

Les modèles animaux d'infection par *N. brasiliensis* sont très utiles pour avoir une meilleure compréhension de la biologie fondamentale de la réponse immunitaire et de l'immunité protectrice, la souris constitue donc le meilleur modèle d'étude pour ce projet. Le recours à ce modèle est indispensable car nous disposons de souris génétiquement modifiées dépourvues de molécules clés pour la mise en place d'une réponse immunitaire efficace dans l'expulsion des parasites. Le nombre maximum de souris sera de 448 souris sur 5 ans. Nous mettrons en œuvre un suivi quotidien du comportement général des animaux pour surveiller le bien-être de l'animal et nous appliquerons des points-limites, comme la perte de poids (si la perte de poids est supérieure à 20% du poids initial, les animaux seront euthanasiés). Nous avons aussi implémenté des procédures pour réduire le nombre d'animaux utilisés, comme de maximiser les paramètres étudiés par souris.

3100. Comment nous-repérons nous dans l'espace, comment savoir où nous sommes, et comment se déplacer de manière optimale vers un objectif? En d'autres termes, comment un souvenir (ici, une représentation mentale de notre environnement) est formé, stocké et restitué afin de permettre à un individu de s'orienter et de naviguer dans son environnement. Il y a déjà plus de 40 ans était caractérisé dans une région cérébrale particulière (l'hippocampe) un groupe de cellules dont l'activité code la localisation de l'animal dans son environnement (les cellules de lieu). Plus récemment, la présence de cellules permettant un codage de la totalité de l'environnement accessible à l'animal a été rapportée dans le cortex cérébral. Ainsi, nous avons caractérisé le réseau neuronal nous permettant de «savoir où nous sommes». Cependant, et de manière étonnante, nous ne savons toujours pas précisément comment notre cerveau code pour la position de l'objectif à atteindre («savoir où aller»). Nous avons récemment mis en évidence l'émergence, au cours de l'apprentissage d'une tâche spatiale, d'un motif d'activité oscillatoire particulier au sein d'une sous-région de l'hippocampe juste avant que l'animal arrive à l'objectif. Nous faisons ainsi l'hypothèse que ce motif particulier coderait pour la localisation du «but à atteindre» dans l'environnement. Afin de tester cette hypothèse, nous combinerons des approches optogénétiques (nous permettant de manipuler avec une résolution temporelle très fine, de l'ordre de la milliseconde, l'activité d'une population spécifique de neurones), électrophysiologiques (nous permettant de caractériser l'activité des réseaux neuronaux de la région d'intérêt) et comportementales sur différents souches de souris nous permettant de manipuler spécifiquement l'activité de neurones particuliers (souris exprimant une protéine spécifique dans certaines populations de neurones). Ainsi, notre projet permettra de mieux comprendre les bases neuronales de la mémoire spatiale. Ce type de mémoire étant précocement altéré dans de nombreuses pathologies neuropsychiatriques, cette étude ouvrira certainement de nouvelles voies de recherches afin de développer de nouvelles médications adaptées aux phases précoces de ces maladies.

Un effort tout particulier est fait pour suivre la règle des 3R. Remplacement: Dans la mesure où nos travaux portent sur l'étude des fonctions mnésiques couplées à des enregistrements intracérébraux, il n'est pas possible de recourir à un autre type de modèle d'étude qu'à celui de l'animal entier éveillé, soumis à des tests comportementaux. Raffinement: Le choix des tests a été guidé pour leurs pertinences par rapport à l'hypothèse à tester. Le choix de l'espèce par son adaptation naturelle à réaliser le test avec un minimum de stress ainsi que sa pertinence par rapport à la question posée (notamment la partie optogénétique). Les sujets d'expériences seront hébergés par groupes de 2 au minimum avec du matériel d'enrichissement dans la cage. Chaque individu sera néanmoins testé individuellement pour minimiser l'impact des interactions sociales avec les processus mnésiques en cours. Tout au long de l'expérience, les animaux sont étroitement surveillés afin de détecter d'éventuels signes

de stress ou de souffrance trop importants. Les animaux présentant des signes d'inconfort trop élevés seront retirés de l'étude. Réduction: le nombre d'animaux nécessaire a été diminué le plus possible (ce projet prévu sur 5 ans utilisera 210 souris mâles) en tenant compte du nombre minimal d'animaux nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement fiables (les tests statistiques utilisés seront des analyses de variance à plusieurs facteurs).