

**Résumés des projets autorisés utilisant des animaux à des fins scientifiques
Premier semestre 2018 (suite et fin)**

7312 Dans le cadre de notre plateforme d'imagerie équipée d'une Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) dédiée aux études précliniques, plusieurs équipes de recherche nous contactent pour mener des études par IRM sur l'évolution ou les modifications anatomo-fonctionnelles ou métaboliques de leurs modèles murins ou bien pour définir et valider l'efficacité de nouveau traitement.

L'IRM, technique d'imagerie biomédicale en perpétuelle évolution, est extrêmement attractive pour les études précliniques. Elle est non invasive et non irradiante. Elle permet :

- de remplacer l'utilisation de techniques plus invasives pour l'obtention d'information similaire ;
- d'avoir des informations anatomo-fonctionnelles et métaboliques complémentaires et/ou inaccessibles par d'autres techniques dans des conditions de bien-être animal sans comparaison. Ces nouvelles informations peuvent être intégrées dans une étude comme nouveau critère d'inclusion ou d'exclusion. Cela permet d'obtenir une meilleure qualité des résultats qui n'auront pas besoins d'être répétés, réduisant ainsi le nombre d'animaux ;
- un suivi longitudinal individuel des modifications anatomo-fonctionnelles et métaboliques permettant ainsi de réduire très significativement le nombre d'animaux nécessaire. L'animal pouvant être ainsi son propre contrôle éliminant les effets de la variation inter-individuelle sur les résultats ;
- d'avoir accès à des biomarqueurs déjà utilisées chez l'Homme quotidiennement dans les services hospitaliers, permettant de développer des projets de recherche translationnelle.

L'IRM offre, à travers plus d'une centaine de séquences, un très large panel d'images avec des contrastes différents, basées essentiellement sur les caractéristiques physiques des protons de l'eau donnant ainsi accès à différentes informations : des informations morphologiques (structurale et basée sur la diffusion de l'eau dans le tissu), paramétriques (mesures quantitatives), fonctionnelles (basée sur l'oxygénation tissulaire, perfusion), et sur le métabolisme. Des agents de contraste exogènes sont nécessaires pour certaines problématiques comme l'observation de la perméabilité vasculaire, le rehaussement du contraste dans une structure d'intérêt.

Dans ce contexte, ce projet a pour objectif de couvrir les expériences IRM des équipes de recherche qui auront déposé en parallèle leur propre demande d'autorisation détaillant leur projet tel que leur modèle animal, les concentrations et les volumes de produits injectés.

Nous estimons à 5 000 le nombre d'animaux couvert par ce projet durant 5 ans (80 % de souris et 20 % de rats). Ce nombre est probablement surestimé puisque l'imagerie permet de suivre un même animal plusieurs fois, ce qui réduit le nombre d'animaux à inclure dans les études des équipes extérieures à la plateforme.

Ce projet sera mené en conformité avec le principe des 3 Rs :

- Réduire: le nombre d'animaux nécessaire à une étude se voit fortement réduit par projet. Puisque chaque animal peut être son propre contrôle en IRM, permettant de suivre l'évolution d'une pathologie sur un même individu et donc de réduire les effectifs.
- Raffiner: en dehors des examens IRM, les animaux sont surveillés quotidiennement et ont accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Ils sont hébergés dans un environnement enrichi permettant la formation de groupes sociaux. Durant les examens IRM, les animaux sont anesthésiés et installés dans une enceinte chauffée. La fréquence respiratoire et la température sont suivies en temps réel.

- Remplacement : nous sommes obligés d'utiliser des animaux car l'objectif du travail est de détecter et de suivre au cours du temps des modifications anatomo-fonctionnelles et/ou métaboliques en prenant en compte la complexité du vivant.

Enfin, nous utiliserons un test statistique non paramétrique, adéquat pour les petits effectifs.

7313 Le cancer du poumon représente la première cause de mortalité chez l'homme en France et dans le monde. Responsable de 40 000 nouveaux cas chaque année en France, le cancer des bronches peut être considéré comme un problème majeur de santé publique dans notre pays. Le tabagisme est responsable de 80 % à 90 % des cas de cancer du poumon. Ce cancer est particulièrement menaçant, car il peut se propager plus facilement dans le reste du corps que d'autres types de cancer car le sang passe par les poumons pour être oxygéné et les poumons sont en contact étroit avec plusieurs vaisseaux sanguins et lymphatiques.

L'introduction des nanomédicaments en médecine, où le médicament est incorporé dans un matériau pour le transporter au site d'action, a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité et une efficacité accrues. Ils permettent le transport spécifique du principe actif à la cellule ou au tissu malade, évitant ainsi les effets secondaires pernicious sur les tissus sains et la protection de la molécule active vis-à-vis de la dégradation dans la circulation sanguine.

Un nouveau type de nanomatériaux, appelé nanoMOF (MOF pour Metal Organic Framework), a été récemment proposé comme transporteur de médicament. Ses capacités d'incorporation de principe actif sont exceptionnelles (jusqu'à 40 fois supérieures à celles des nanomatériaux déjà connus) avec une libération progressive et en prime des propriétés en imagerie médicale.

Une de ses propriétés physico-chimiques, qui aurait pu être un inconvénient va être exploiter dans le cadre du cancer du poumon. En effet, ces nanoparticules, stables en milieu acide, forment des agrégats réversibles en milieu neutre tel que le sang. Ces agrégats ont la bonne taille pour être filtrés et retenus un moment dans les capillaires pulmonaires où ils vont rapidement se désagréger.

Des études *in vitro* ont montré qu'après désagrégation, les nanoparticules individuelles peuvent pénétrer dans les cellules pour y délivrer leur principe actif.

Ces nouveaux médicaments à base de nanoMOF auraient donc 2 avantages majeurs : cibler passivement le poumon pour y délivrer le médicament tout en limitant les quantités de nanomatériaux injectés qui sont potentiellement toxiques à fortes doses. Ils ouvrent de nouvelles perspectives dans le traitement du cancer du poumon.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'activité thérapeutique de nanoMOF chargées en gemcitabine qui est une molécule anticancéreuse sur un modèle expérimental de cancer du poumon.

Le développement de cancer de poumon est une somme de processus physiopathologiques complexes découlant d'interactions vasculaires, tissulaires, cellulaires et moléculaires. Cette approche basée sur la filtration passive des nanoparticules dans les capillaires pulmonaires n'est pas modélisable *in vitro*. Ainsi pour améliorer la compréhension de ces multiples processus et pouvoir développer de nouvelles thérapies, le recours à l'animal est indispensable.

Des cellules de cancer du poumon seront injectées par voie intraveineuse pour induire la formation de métastases pulmonaires et les souris seront traitées avec les nanoMOF chargées en gemcitabine et les traitements contrôles. Les nanoMOF pourront être modifiées en surface afin d'améliorer leur performance telle que l'absorption par les cellules tumorales. On prévoit de réaliser 6 études sur 5 ans ce qui nécessitera 323 souris.

Le bien-être des animaux sera pris en compte. Toutes les procédures seront pratiquées sous anesthésie. Les animaux seront observés tous les jours et des points limites très précoces seront mis en place afin de limiter la douleur animale. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress.

7314 Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez l'animal en vue de déterminer les paramètres pharmaco- et toxicocinétiques (PK et TK) d'un produit et/ou d'identifier le métabolisme *in vivo*.

Ces études peuvent avoir plusieurs objectifs :

- déterminer les paramètres d'Administration/ Distribution/ Métabolisme/ Elimination (ADME) et sélectionner les molécules ayant les meilleurs profils ADME parmi une série de molécules,
- comparaison de la biodisponibilité et autres paramètres pharmacocinétiques de différentes formulations et/ou voies d'administration et/ou sels de molécule, pour vérifier la bonne exposition et permettre ainsi d'évaluer l'efficacité et la toxicité dans les études ultérieures,
- comparaison du profil ADME lors d'un changement de formulation ou de sel de la molécule ou entre plusieurs espèces
- ajuster les doses et/ou le schéma expérimental des essais précliniques
- aider au choix de l'espèce non rongeur pour les études réglementaires de toxicologie
- aider à l'interprétation des données pharmacologiques et toxicologiques

Les objectifs sont en conformité avec le principe des 3R (remplacer, réduire, raffiner). S'il n'est pas possible de remplacer complètement l'usage du modèle animal (organisme entier complexe), des méthodes alternatives *in vitro* et *in silico* sont utilisées au préalable dans la caractérisation et la sélection des molécules dans les stades précoces du développement. Avec relativement peu d'animaux par groupe, un traitement généralement unique à des doses généralement sans effet adverse et en utilisant des procédures expérimentales moins contraignantes, ces études permettent de réduire le nombre de molécules à tester et le nombre d'animaux utilisés par la suite. Elles aident également à affiner le choix de doses et le schéma expérimental des études ultérieures de sécurité et d'efficacité pour mieux anticiper et éviter de multiplier les procédures.

En fonction de l'objectif, ces études pharmacocinétiques peuvent être conduites chez les rongeurs (rat, souris ou lapins) ou les non rongeurs (chien ou primate non humain).

Ces études consistent principalement en une administration suivie de plusieurs prélèvements de sang (volume et fréquence conformes aux recommandations et en utilisant les méthodes les moins contraignantes possibles, par exemple : *microsampling* et/ou *training* avec renforcement positif). Des collectes d'urine sur des durées < ou = à 24h peuvent également être prévues (via des systèmes de récolte placés sous les cages pour éviter de les mettre en cage à métabolisme, ce qui est aussi un raffinement).

Selon le nombre de candidats médicaments qui atteindront l'étape de validation « *in vivo* », chaque année, un maximum de 600 rats, 800 souris, 50 lapins ou de 40 chiens ou 40 singes sera utilisé (dont des animaux réutilisés).

7315 Lors de la greffe rénale, le rein manque d'oxygène pendant plusieurs heures avant d'être greffé. Certaines parties essentielles à la fonction rénale sont alors endommagées, comme les tubules rénaux qui permettent la fabrication de l'urine.

Les lésions des tubules rénaux peuvent récupérer, et ainsi permettre l'arrêt de la dialyse, mais les mécanismes en sont peu connus. Les travaux menés dans notre laboratoire ont permis de découvrir le rôle particulièrement inattendu de l'urothélium intrarénal dans ces processus de régénération rénale. L'urothélium représente la couche de cellules en contact avec les cavités urinaires. Outre ses fonctions de barrière de protection, cet urothélium produit également des facteurs de croissance associés à la régénération tubulaire, tel que le FGF7.

Nous mettrons au point un modèle de souris qui, grâce à l'expression d'un récepteur « transgénique », permet une destruction sélective de l'urothélium rénal pour une période déterminée.

Nous évaluerons l'importance de ces cellules dans la récupération tubulaire, et les molécules permettant cette régénération tubulaire, même en l'absence d'urothélium. L'objectif de cette étude est d'identifier les mécanismes responsables des processus de lésion et de réparation tubulaire durant l'ischémie-reperfusion rénale qui est un modèle expérimental mimant la greffe rénale au plan hémodynamique. Un protocole d'ischémie-reperfusion bien connu du laboratoire (clampage de

l'artère rénale pendant 45 minutes puis déclampage) sera utilisé dans ce modèle murin d'ablation conditionnelle de l'urothélium. Le rôle des facteurs de croissance dépendants et indépendants de l'urothélium seront analysés dans la lésion et la réparation tubulaire. Les souris ne sont pas sensibles à la toxine diphtérique, puisqu'elles n'expriment pas son récepteur. L'ablation conditionnelle de l'urothélium sera donc réalisée par l'injection de toxine diphtérique dans un modèle de croisement Cre-Lox permettant d'exprimer le récepteur de la toxine diphtérique sous le contrôle du promoteur de l'uroplakine IIIa (exprimée seulement dans l'urothélium). Les lésions tubulaires, l'inflammation parenchymateuse et la régénération tubulaire seront étudiées au décours de l'ischémie-reperfusion, avec ou sans administration de FGF7. Des analyses différentielles par microarray permettront d'identifier les facteurs paracrines sécrétés par l'urothélium et impliqués dans la régénération tubulaire.

Les animaux seront atteints d'une pathologie rénale associée à différents symptômes. Cependant, grâce à l'expérience de notre unité dans ce type de pathologie et dans un souci de respect du bien-être des animaux, nous avons prévu de mettre en place des critères d'interruption des procédures expérimentales basés sur des paramètres mesurables non invasifs tels que la variation du poids corporel, la mesure de la pression artérielle ou encore la surveillance du comportement des souris. Ainsi, nous pourrions éviter des souffrances non nécessaires aux animaux.

Nous veillerons donc à respecter la règle des 3 R :

Réduction : effectif calculé au plus juste à partir des tests de comparaison de moyenne qui permettent de définir le nombre d'individus nécessaires. Pour toutes les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre, le nombre de souris par groupe sera de 10.

Raffinement : Le FGF7 déjà utilisé dans notre laboratoire n'est suivi d'aucun signe de mauvaise tolérance par les souris ; il s'agit par ailleurs d'un traitement utilisé chez l'homme qui est également bien toléré. Les animaux sont surveillés au quotidien avec des critères définis et le recours à l'anesthésie et analgésie sont prévus pour éviter toute souffrance. Les animaux disposent également d'un enrichissement du milieu.

Remplacement : Cette étude ne peut pas être limitée à une approche in vitro qui ne prend pas en compte les interactions multiples qui existent entre divers types cellulaires et notamment les épithéliums qui sont des structures hautement organisées (urothélium, épithélium tubulaire, cellules immunitaires circulantes et résidentes).

Grâce à nos données préliminaires concernant la prolifération urothéliale et tubulaire, nos expériences de mise au point seront limitées et le nombre total de souris utilisées pour le projet sera de 1010 sur 4 ans.

Ces résultats devraient ouvrir la voie à des essais thérapeutiques utilisant ces facteurs de croissance dans l'optique d'accélérer la réparation rénale lors de la greffe rénale. Ils pourraient également fournir des nouveaux marqueurs prédictifs non invasifs de dommage tissulaire et de récupération rénale chez l'homme.

7316 Le rein réabsorbe les ions nécessaires à l'organisme après leur ultrafiltration à partir du plasma sanguin. Cette réabsorption s'effectue par les tubules rénaux grâce à une grande diversité de protéines membranaires transporteuses d'ions présente à la membrane des cellules épithéliales rénales, dont les canaux ioniques. Pour certains d'entre-deux, leurs propriétés fonctionnelles, leur localisations intrarénale et leur implication dans la fonction rénale est clairement établie. Ainsi, le dysfonctionnement du canal à perméabilité potassique Kir4.1/Kir5.1 présent tout le long du le néphron distal est à l'origine des traits phénotypiques rénaux du syndrome SeSAME chez l'Homme. Pour d'autres, en revanche, leurs localisations tissulaires rénale, leurs fonctions physiologiques et leurs potentielles implications en pathologie rénale restent à déterminer.

Des données préliminaires de notre laboratoire suggèrent la présence d'un canal potassique Kir4.2, proche du canal Kir4.1, dans la partie proximale du néphron, mais sa localisation intrarénale précise et son rôle dans la fonction rénale restent inconnues. Nous avons émis l'hypothèse que ce canal pourrait être impliqué dans une fonction bien spécifique du tubule proximal, notamment liée à l'équilibre acido-basique de l'organisme.

Ce projet vise à déterminer la localisation intrarénale et la fonction des canaux Kir4.2. Il s'appuie sur la mesure de la fonction rénale d'un modèle de souris chez lequel le gène *Kcnj15* codant la protéine Kir4.2 a été invalidé et sa comparaison avec celle de souris sauvages, sur l'identification moléculaire du canal et sa localisation intrarénale.

Il s'agit d'un projet scientifique original qui n'a fait l'objet d'aucune publication antérieure d'un laboratoire national ou étranger, et les résultats obtenus permettront, à terme, d'envisager son implication lors de manifestations pathologiques humaines dont l'origine reste inconnue.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 72 souris. Ce nombre, qui prend en compte les exigences de remplacement et de réduction, est incompressible : les méthodes actuelles de substitution in vitro et in silico ne permettent pas encore de répondre aux questions posées, le rôle de ce canal au sein de l'organe et de l'organisme entiers ne peut être déterminé que chez des modèles animaux. D'autre part, durant l'élaboration de ce projet, une attention particulière a été portée en vue de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en expérimentation et à la validité des résultats obtenus, notamment par la réalisation préalable de protocoles précis et détaillés associés à des tests statistiques adaptés afin d'éviter les répétitions inutiles. De plus, les procédures se dérouleront sous une surveillance journalière stricte de leur bien-être et des points limites bien établis seront respectés, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire. Enfin, les animaux seront hébergés selon les normes de stabulation en vigueur (température, éclairage, ventilation, alimentation et boisson à volonté, nombre d'animaux/cage, litière renouvelée une fois/semaine, enrichissement du milieu par tunnels en carton et nid végétal).

7317 Ce projet a pour but de définir les paramètres optimaux du laser permettant de garantir une ablation tissulaire du canal biliaire, du canal pancréatique principal, tout en épargnant les structures anatomiques environnantes dans le traitement du cholangiocarcinome et des tumeurs intra canalaire papillaire et mucineux du pancréas (IPMN).

Le traitement tumoral par thérapie est de plus en plus pratiqué dans le monde. Cependant une des limitations techniques actuelles permettant d'induire une hyperthermie est la délivrance et le ciblage de l'hyperthermie au site souhaité. Le défi dans le traitement des tumeurs enracinées comme celles trouvées dans le pancréas est d'éviter d'endommager les zones saines adjacentes tout en assurant une hyperthermie adéquate dans le tissu néoplasique ciblé.

L'ablation au laser est une méthode mini invasive de traitement des tumeurs d'organes solides permise par la redirection de l'énergie produite par un laser de basse puissance au travers de fibre optiques. L'ablation par laser (LA) déjà été utilisée pour le traitement percutané de tumeur primaire hépatique, de métastases hépatique, pour le traitement de tumeurs neuroendocriniennes pancréatiques ou encore pour le traitement de nodules hépatiques malins.

Cependant, seul une étude ex-vivo pour l'utilisation de LA au niveau bilio-pancréatique est reporté dans la littérature. Or cette technique pourrait être bénéfique pour les patients présentant de hauts risques de complication chirurgicale en particulier dans le traitement de tumeur obstructive ou encore dans le traitement des lésions du conduit pancréatique.

Une autre pathologie, le cholangiocarcinome, un adénocarcinome agressif provenant des cellules épithéliales du conduit biliaire, est souvent diagnostiqué aux stades III ou IV, stades non résécables. L'obstruction du canal biliaire conduit à un syndrome de malabsorption, une dysfonction hépatique et une cirrhose biliaire. A terme, ces événements conduisent à une dysfonction majeure du foie, cause principale de mortalité.

Les traitements actuels sont basés sur :

L'installation d'un stent. Cette technique permet de diminuer la jaunisse et augmente la survie du patient avec une morbidité plus faible que par chirurgie.

Cependant, cette technique présente de nombreuses complications les principales étant l'occlusion du stent, ou sa migration.

Thérapies locorégionales :

La photochimiothérapie : Des résultats prometteurs ont été observés pour la décompression biliaire. Cependant cette technique est limitée par son coût, et la présence de complications tels que la présence d'abcès hépatique, la photo toxicité, ou la cholangite.

La radiofréquence : L'augmentation de la survie suite à l'utilisation de cette technique n'est pas encore démontrée. Elle est principalement utilisée pour faciliter l'insertion d'un stent et est associée à de nombreuses complications : cholangite, saignement biliaire, pancréatite...)

L'utilisation de LA avec des paramètres adaptés permettra de restaurer la perméabilité du conduit biliaire, tout en évitant les complications associées aux autres techniques mini-invasives.

D'autres applications de LA peuvent être proposées pour le traitement par chirurgie percutanée (non invasive) des IPMN.

Ce projet respecte la règle des 3R :

Remplacement : Afin d'évaluer la faisabilité et la sécurité pour le patient et le staff médical dans la réalisation d'une ablation laser du conduit bilio-pancréatique l'utilisation de l'animal vivant est indispensable. Le porc est un modèle de choix de par sa taille et son anatomie bilio-pancréatique similaire à l'Homme.

Réduction : C'est une étude préclinique préliminaire permettant d'évaluer l'utilisation de la LA comme potentiel traitement des cholangiocarcinomes ou IPMN non résécables. Il n'y a pas d'études similaires permettant d'évaluer le nombre d'animaux nécessaire. Cependant, nous avons identifiés que 10 animaux seraient suffisants pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. Afin de minimiser le nombre d'animaux utilisés, plusieurs expériences seront réalisées sur un animal. Ainsi, 4 ablations seront réalisées par animal (1 dans le canal biliaire principal, 1 dans le conduit intra-hépatique gauche, 1 dans le conduit intra-hépatique droit, 1 dans le canal pancréatique principal).

Raffinement : Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésies générales avec contrôle de la douleur et seront sans réveil.

7318 Ce projet a pour objectif l'évaluation préclinique de la faisabilité de la navigation guidée par l'image lors de la dissection du ganglion pelvien latéral (LPND) en démontrant sa précision et sa sécurité dans le ciblage des repères anatomiques pelviens.

Le cancer rectal constitue environ un tiers de tous les cas de cancer colorectal. L'excision mésorectale totale (TME), décrite d'abord par RJ Heald, est devenue la norme dans le traitement du cancer rectal, puisqu'elle permet de réduire les taux de récurrence locale de manière spectaculaire. Toutefois, le TME ne nécessite aucune approche particulière pour les ganglions lymphatiques du pelvis latéral, ce qui peut être une source de récurrence locale. L'incidence de la métastase ganglionnaire latérale dans le cancer du bas rectum était d'environ 15% dans la littérature. Par conséquent, la LPND peut être effectuée avec le TME pour le traitement de cancers rectaux localement avancés avec intention curative. Les indications pour une LPND ne sont pas limitées au cancer rectal avancé, mais elles s'étendent à l'oncologie gynécologique (comme par exemple le cancer ovarien, le cancer du col de l'utérus, le cancer de l'endomètre), à l'oncologie urologique (comme le cancer de la prostate et de la vessie, et à l'exentération pelvienne pour toute sorte de malignité pelvienne avancée ou récidivante.

Toutefois, la LPND est techniquement exigeante et donne lieu à des taux de morbidité plus élevés. Le TME avec la LPND nécessitent des temps opératoires plus longs et induisent des pertes de sang significativement plus grandes. En particulier, étant donné que les vaisseaux principaux le long de la paroi pelvienne latérale sont recouverts de péritoine, il n'est pas facile d'identifier leurs structures tridimensionnelles complexes. La dissection aveugle sans guidage par l'image peut endommager les vaisseaux ou les nerfs principaux, ce qui entraînera une morbidité grave ou une mortalité hospitalière.

La navigation guidée par l'image a été employée dans de nombreuses régions cliniques comme le cerveau, en maxillo-facial, au niveau de la colonne vertébrale, en chirurgie orthopédique et en radiologie interventionnelle. Il est utile de localiser, cibler et guider lorsqu'une cible ne peut pas être vue directement. L'intégration de cette technologie dans la LPND permet au chirurgien d'éliminer un certain nombre d'hypothèses, de réduire le caractère invasif de la chirurgie et de pallier au manque d'expérience. Bien que l'application clinique de la navigation guidée par l'image dans des tissus mous comme les organes gastro-intestinaux et d'autres organes abdominaux représente toujours un défi,

la LPND peut être un bon candidat pour la navigation guidée par l'image car le bassin osseux est une composante rigide du corps humain et les vaisseaux principaux sont relativement fixés à la paroi pelvienne.

Compte tenu de la complexité de l'anatomie pelvienne et de la difficulté technique de la LPND, la navigation guidée par l'image peut être optimisée pour améliorer la précision et la sécurité de la LPND en fournissant un guidage par l'image très précis en 3 dimensions.

Le projet répond aux exigences 3R :

Remplacement : Pour évaluer la précision et la sécurité de la navigation guidée par l'image lors d'une LPND en phase préclinique, le recours à l'animal vivant est nécessaire. Le porc est un modèle de choix, par sa taille et son anatomie intra-pelvienne comparable, permettant d'évaluer la faisabilité du système de navigation actuellement disponible pour une LPND.

Réduction : Il s'agit d'une étude pilote préclinique pour évaluer l'applicabilité du système de navigation actuellement disponible pour réaliser une LPND et valider sa précision. Il n'existe pas de base statistique pour déterminer le nombre d'animaux. Afin de réduire le nombre d'animaux, un total de 16 repères anatomiques dans chaque animal sera évalué pour atteindre la précision du positionnement cible. Conformément au principe de réduction, nous estimons que 80 mesures réalisées à partir de 5 animaux représentent un nombre nécessaire et suffisant pour s'assurer de l'exactitude du système de navigation.

Raffinement : Le projet comprend des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle peropératoire de la douleur, sans étudier la survie, et ne nécessite donc pas de soins postopératoires spéciaux.

7319 Objectifs :

Ce projet a pour objectif de répondre aux exigences réglementaires du dossier d'autorisation de mise sur le marché (AMM). Les tests ont pour but d'effectuer la production de réactifs nécessaires aux laboratoires pour effectuer et valider les tests in vitro, et ainsi limiter le nombre d'animaux utilisés dans les procédures de contrôles qualité ayant pour but la libération d'un lot pharmaceutique.

Ils sont effectués sur espèce rongeurs et lapins.

Avantages et dommages :

Aucun dommage n'est attendu, un léger stress lié aux manipulations et injection des produits peut apparaître.

Toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé et compétent.

Ces tests garantissent la qualité du produit pour les animaux et leur environnement.

Ces tests permettent la libération de vaccins qui protègent efficacement les animaux contre les maladies infectieuses, améliorent directement la qualité sanitaire des élevages et assurent un meilleur bien-être animal.

Informations sur les espèces utilisées :

Pour libérer le nombre nécessaire de doses de vaccins sur le marché ; jusqu'à 200 cobayes, 200 hamsters, 50 lapins, 150 rats et 600 souris seront nécessaires, soit 1200 animaux sur 5 ans. Les nombres utilisés varient d'année en année et en fonction du nombre de production de sérums à effectuer.

Mise en avant des 3R :

Remplacement : La réalisation des contrôles in vitro nécessite la production de réactifs. Actuellement, cette production est possible uniquement sur un modèle in vivo. Aucun modèle in vitro alternatif n'a pu être mis au point.

Réduire : le nombre d'animaux est fixé par les laboratoires en fonction de leurs besoins et du type de réactifs nécessaire. Il n'est actuellement pas possible de le réduire.

Raffinement : dans ce projet, aucune souffrance ou stress significatif est attendu.

Les conditions d'hébergement varient selon l'espèce et l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

Chaque année, 85 millions d'unités de globules rouges (GR) sont transfusées dans le monde. Ceci est un défi humain et organisationnel exigeant généralement mené par des organisations nationales qui collectent, traitent et distribuent les produits sanguins. La lésion de stockage, c'est à dire l'ensemble des altérations des GR en banque, et l'état du receveur au moment de la transfusion seraient responsables de l'élimination rapide des GR après transfusion. Ces mécanismes d'élimination ne peuvent être mimés par des études in vitro puisqu'ils impliquent plusieurs tissus et types cellulaires dans un contexte physiologique global. Cependant, la complexité et le coût des études cliniques de rendement transfusionnel chez l'homme nous orientent vers une étape intermédiaire de vérification de nos hypothèses dans un modèle murin in vivo.

Des globules rouges de souris stockés en banque pendant 14 jours (correspondant à un modèle des 42 jours de conservation chez l'homme) seront transfusés à des souris receveuses dans différents modèles afin de vérifier nos hypothèses sur l'importance de l'état du receveur sur les mécanismes d'élimination des GR. Ainsi, certaines souris receveuses seront splénectomisées ou déplétées en macrophages afin de vérifier l'importance de cet organe et de ces cellules dans l'élimination des GR. Des souris anémiées (par phlébotomie ou carencées en fer) seront utilisées comme souris receveuses afin de déterminer l'impact de l'anémie sur les mécanismes d'élimination des GR. L'effet de l'érythropoïétine (hormone EPO) ou de drogues reconnues dans le traitement de l'anémie, sera également testé en parallèle. A la fin des traitements et après la transfusion, les souris seront euthanasiées pour prélèvement de sang et d'organes.

Le nombre de souris utilisées sera de 468. Pour éviter toute souffrance, la phlébotomie sera réalisée sous anesthésie générale. Un suivi régulier du degré d'anémie, du comportement et de l'apparence physique sera effectué et les animaux qui atteindraient un point limite seront immédiatement mis au repos. Les cages des animaux bénéficieront d'enrichissements. Dans le but d'utiliser un minimum d'animaux, notre groupe développe en parallèle des projets de recherche in vitro sur les globules rouges humains.

A terme, ce projet permettra d'identifier et de caractériser les mécanismes d'élimination du GR, chez le receveur, et de maximiser l'efficacité transfusionnelle. Le développement de molécules permettant de cibler ces mécanismes pourrait avoir une importance majeure en médecine transfusionnelle, et dans le contexte médical général, au vu du grand nombre de patients transfusés chaque année.

7320 Les carcinomes cutanés constituent la principale cause de cancers cutanés chez l'homme. Ils sont provoqués par une exposition excessive aux rayonnements ultra-violets du soleil. Lorsque la nature des lésions le permet, un traitement chirurgical est mis en oeuvre, précédé ou suivi d'une thérapie médicamenteuse destinée à réduire la taille de la tumeur avant exérèse ou prévenir l'apparition de nouvelles lésions après l'intervention.

Le présent projet vise à reproduire chez la souris l'apparition de cancers de la peau causés chez l'homme par l'exposition régulière au soleil (rayonnements UV-B). Les souris, appartenant à une souche dépourvue de poils, sont exposées environ dix minutes par jour et pendant plusieurs semaines à un rayonnement UV-B dont l'intensité est mesurée et contrôlée. La procédure est interrompue avant l'apparition des premières lésions de carcinome qui surviennent dans les semaines qui suivent l'arrêt de l'exposition. L'apparition des lésions cutanées, suivie par un examen clinique quotidien, conditionne la durée et l'intensité de l'exposition préalable aux UV-B de façon à obtenir le type et le degré de sévérité du modèle visé.

Une fois la pathologie en place, les animaux sont traités avec différents candidats médicaments, en complément d'une chirurgie visant à retirer les lésions cutanées, dans le but d'évaluer leur efficacité et leur innocuité.

Le bénéfice attendu de ce projet est très important car il permet de démontrer au travers d'un modèle expérimental, l'intérêt de nouvelles thérapies dans les cancers cutanés combinant traitement médicamenteux et chirurgie. Ainsi, seules les molécules les plus efficaces poursuivent les étapes de développement. Les procédures expérimentales mises en œuvre interviennent après une sélection des molécules d'intérêt sur des modèles in vitro, par exemple selon leur affinité et leur sélectivité pour la cible pharmacologique visée.

Remplacer ce modèle expérimental par des tests in vitro n'est pas possible car l'ensemble des interactions anatomiques et fonctionnelles d'un organisme vivant sont nécessaires pour évaluer l'efficacité d'une molécule active avant ou après exérèse chirurgicale d'une tumeur cutanée au travers respectivement de sa capacité à réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie ou d'éviter sa réapparition après la chirurgie. La réduction du nombre d'animaux nécessaires s'opère au travers :

- d'une répartition arbitraire soignée des animaux par rapport à la localisation et la sévérité des lésions induites,
- des critères d'évaluation quantitatifs et pertinents qui permettent d'objectiver plus facilement des différences significatives sur un nombre limité de sujets,
- de l'utilisation de ces modèles seulement pour les molécules les plus prometteuses, sélectionnées au préalable à partir de tests in vitro.

Le raffinement des procédures expérimentales se traduit par un contrôle strict de l'exposition aux UV-B garantissant l'absence de lésions inflammatoires cutanées du type « coup de soleil », une anesthésie des animaux lors de l'exérèse des tumeurs cutanées et des traitements par voie locale, la mise à disposition d'enrichissements dans les cages (exemple : matériel de nidification, bâtonnet à ronger) et une surveillance clinique particulière pendant toute la durée de l'étude.

Un effectif maximal de 1260 souris sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

7321 Le projet consiste à étudier le rôle des cellules immunitaires de l'intestin dans l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux (anti-PD1) en fonction de la composition de la flore intestinale. L'anti-PD1 est un anticorps qui permet une réinduction de la réponse immunitaire qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses.

Cependant, certains patients développent une résistance à ce traitement. Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans l'activation du système immunitaire anti-tumoral. Permettant ainsi d'améliorer l'effet de thérapies anti-cancéreuses dont l'anti-PD1. Or chez les patients atteints d'un cancer, de nombreux facteurs entraînent un déséquilibre de la flore intestinale pouvant être impliqué dans la résistance aux traitements.

Par conséquent, notre objectif est de déterminer si la résistance à l'anti-PD1 peut dépendre de la composition de la flore intestinale de patients et déterminer les bactéries pouvant être impliquées dans la sensibilisation des patients ne répondant pas au traitement anti-PD1. Pour cela, nous collectons les fèces de patients atteints de cancer (répondeurs ou non à l'anti-PD1) afin de réaliser des transplantations fécales chez la souris, qui possèdera alors les bactéries de la flore intestinale des patients. Puis nous administrerons des bactéries ayant été démontré comme activant la réponse immunitaire anti-tumorale. Après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec l'anti-PD1 et le suivi de croissance tumorale nous permettra de déterminer si la bactérie augmente la réponse au traitement. Ces manipulations vont permettre de sélectionner les patients pouvant bénéficier d'une supplémentation en bactéries « bénéfiques » impliquées dans l'amélioration de la réponse au traitement anti-PD1. Par ailleurs, nous analyserons l'impact d'une supplémentation en bactéries et d'un traitement anti-PD1 sur l'activation des différentes cellules du système immunitaire intestinal.

Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité et l'effet des thérapies et combinaisons thérapeutiques sur la réponse anti-tumorale avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire in vitro ou ex vivo.

Les animaux seront implantés avec des tumeurs en sous-cutanées ou en site orthotopique (tumeurs du poumon) comme modèles des maladies humaines, pour l'amélioration des thérapies anti-PD1.

Le projet nécessitera 6192 souris. Ce nombre d'animaux se justifie par la diversité des modèles de tumeurs, du nombre de fèces de patients et les différentes voies de signalisation étudiées.

Les groupes seront constitués du minimum d'animaux nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement exploitables (calcul de puissance). Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux (toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie générale ou locale, une analgésie sera assurée grâce à la buprénorphine). Les animaux bénéficieront en tout temps d'un enrichissement environnemental (cocoons, maisons en carton) et seront gardés en groupes sociaux.

7322 Le cancer de la prostate est un problème de santé publique car il représente le cancer le plus fréquent chez les hommes en Europe. La progression de ce cancer hormono-dépendant dépend des androgènes. Ainsi, le traitement le plus commun pour les patients atteints de cette maladie consiste en une castration médicale ayant pour conséquence une suppression androgénique. Cependant, la majorité de ces patients finit par rechuter et développe un cancer résistant à la castration. Cet échappement est lié à l'émergence de mutants du récepteur des androgènes (RA). Par ailleurs, les androgènes sont essentiels mais pas suffisants pour induire la progression du cancer de la prostate. En effet, la tumeur a besoin d'un micro-environnement permissif et réactif pour devenir maligne et induire le phénomène de métastases. Ce micro-environnement tumoral joue un rôle très important dans la coopération entre les cellules tumorales et les cellules avoisinantes ayant pour conséquence l'induction de la progression tumorale.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'influence des variants du RA, impliqués dans la résistance à la castration, sur le micro-environnement tumoral dans un modèle de cancer de la prostate chez la souris immunodéficiente Swiss Nude. Le cancer est induit par l'injection de cellules cancéreuses LNCaP et PC3 directement dans la prostate de la souris. La 1^{ère} lignée cellulaire est sensible aux androgènes et ne comporte pas ou peu de variants du RA alors que la 2^{ème} est androgéno-indépendante et servira donc de contrôle positif. Nous pourrions ainsi étudier les effets des variants du RA à l'aide de transfections dans les cellules LNCaP. Les modifications du micro-environnement induites par les cellules tumorales seront étudiées en imagerie in vivo TEMP/TDMX et TEP/TDMX lors d'études longitudinales à l'aide de traceurs radioactifs.

Dans cette étude 524 souris nude seront injectées avec des cellules LNCaP et leur variants et PC3 en orthotopique et en sous cutané. la règle des 3R sera respectée.

Raffinement : Les animaux seront placés à plusieurs par cage et leur environnement sera enrichi avec des tubes en PVC

Réduction : nous utiliserons 6 à 12 souris par groupe à l'inclusion pour pouvoir faire des statistiques sur les résultats obtenus. Ce nombre d'animaux par groupe est suffisant pour s'affranchir des effets de variabilité. Le test statistique utilisé est le Mann et Whitney.

Remplacement: L'objectif de ce travail étant de montrer l'influence du micro-environnement tumoral sur la progression tumorale, elle ne peut se faire que sur des animaux.

Le développement embryonnaire dépend de l'activation coordonnée de programmes génétiques spécifiques. L'expression des gènes est contrôlée à différents niveaux, notamment lors de la transcription de l'ADN en ARN. Or, il semble que l'activation de la transcription soit particulière dans l'embryon par rapport à l'adulte. Ce projet de recherche fondamentale vise à étudier la transcription dans l'embryon grâce à une nouvelle approche plus puissante que les outils disponibles actuellement. Ce projet de recherche fondamentale permettra de mieux comprendre les mécanismes qui contrôlent l'expression des gènes et qui peuvent éventuellement conduire à des pathologies s'ils sont dérégulés.

Nous souhaitons étudier l'expression génique, en conditions physiologiques et en absence d'un gène important pour le développement embryonnaire, au niveau de la partie postérieure de l'embryon à 9,5 jours de développement qui correspond à un moment où plusieurs processus de morphogénèse ont lieu. Nous souhaitons utiliser une nouvelle méthode permettant le marquage pendant un court laps de temps des ARN nouvellement synthétisés qui seront ensuite purifiés et analysés par séquençage. Pour cela nous aurons besoin de 258 souris afin de réaliser les analyses de l'expression génique de façon robuste.

Remplacement: nous souhaitons étudier l'expression génique dans le mésoderme dans un environnement physiologique car aucun modèle cellulaire ne permet de récapituler fidèlement le tissu mésodermique et sa complexité.

Réduction: la technique a déjà été optimisée dans des modèles cellulaires. Nous avons inclus dans notre nombre d'animaux des triplicats pour l'analyse transcriptomique.

Raffinement: les procédures se résument à une injection non toxique et non douloureuse, très limitée dans le temps puisque les animaux sont euthanasiés au maximum 6 heures après l'injection afin de récupérer les embryons, et ne nécessite pas de briser l'environnement social des souris.

7323 L'épilepsie revêt des formes électrocliniques diverses, induisant plusieurs dizaines de syndromes épileptiques définis par l'âge d'apparition, le type de crises et l'aspect de l'électroencéphalogramme (EEG). Bien que l'épilepsie débute souvent dans l'enfance, les laboratoires pharmaceutiques se sont plutôt attachés à développer des médicaments antiépileptiques actifs vis-à-vis des épilepsies de l'adulte. En réalité, l'enfant souffre d'épilepsies dont les conséquences motrices et cognitives – retard mental, autisme, crises épileptiques pluriquotidiennes avec chutes traumatisantes – sont graves et pour lesquelles il n'existe pas de traitement véritablement efficace.

Malgré le besoin considérable, l'industrie pharmaceutique rechigne à s'investir dans un marché de niche et dans des études cliniques contraignantes sur le plan éthique. La découverte des mécanismes physiopathologiques impliqués dans ces maladies rares contribue à identifier des cibles thérapeutiques originales et prometteuses. Notre équipe est composée de médecins épileptologues et pédiatres confrontés quotidiennement à la réalité du terrain hospitalier, de neurobiologistes et de pharmaco-chimistes ; tous ont décidé de relever le défi.

Une chimiothèque de 120 molécules a été synthétisée et testée in vitro et ex vivo. Les résultats des tests in vitro et ex vivo ont permis de sélectionner et « hiérarchiser » les molécules selon des critères suivants : (i) biologiques (efficacité in vitro et ex vivo), (ii) pharmacocinétiques (dont le passage de la barrière hémato-encéphalique) mais aussi, (iii) physico-chimiques (hydrosolubilité, stabilité, formulation). Deux brevets ont été déposés à l'international, le premier, le 31 août dernier et le second vient d'être déposé. Une sélection drastique est effectuée grâce à un test biologique réalisé sur tranches de cerveaux prélevés sur le jeune souriceau transgénique. Ce crible très sélectif nous permet au final de ne retenir que quatre molécules particulièrement prometteuses et de réduire ainsi au maximum le nombre d'animaux transgéniques sur qui seront faites ces études. Il s'agit de souris transgéniques constituant un modèle fiable d'épilepsie génétique humaine. Ces essais in vivo (qui comportent un enregistrement EEG intracrânien), objet du présent dossier, sont indispensables à l'établissement de la preuve du concept. Cette étape est nécessaire car l'épilepsie correspond à une pathologie des réseaux neuronaux qui ne concerne pas seulement le cortex cérébral mais aussi ses connexions sous-corticales. Il n'existe donc aucun modèle in vitro permettant de se soustraire à cette étude in vivo. La preuve de concept de l'efficacité de la molécule dans un modèle animal (reproduisant la symptomatologie observée en clinique) est incontournable pour engager par la suite les phases cliniques. Cette phase préclinique précoce sera exigée par les Autorités réglementaires dans le cadre de cette recherche pharmaceutique.

Tout au long de ces études in vivo, nous nous engageons formellement à respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner), en nous limitant tout d'abord aux seules expériences indispensables. Remplacement : Comme il a été mentionné plus haut, d'une part, aucun modèle in vitro ne permet de se soustraire à une telle étude in vivo. Et d'autre part, l'épilepsie humaine est une pathologie complexe qui implique à la fois les réseaux corticaux et sous-corticaux, que seule l'expérimentale animale est capable de mimer. Réduction : Notre stratégie est totalement gouvernée par la recherche d'une économie maximale des animaux : à commencer dans les études in vitro réalisées sur culture cellulaire et sur tranches de cortex d'animaux transgéniques. Ces études nous permettent de sélectionner la(les) meilleure(s) molécule(s) destinées à l'essai in vivo. Raffinement : Pour chaque procédure, si le nombre d'animaux est minimalisé, la durée de l'étude et la souffrance auxquelles ils sont soumis, sont des paramètres qui ne nous ont pas échappé. Aucune technique autre que celle de l'enregistrement EEG éveillé, n'est connue pour identifier l'effet d'une molécule sur les crises épileptiques. Il s'agit d'une technique communément utilisée en clinique humaine (« neurochirurgie éveillée ») afin de guérir le jeune patient épileptique.

Avant toute expérimentation, le protocole sera soigneusement établi, rédigé avec des points limites et transmis aux personnels techniques. Les animaux seront surveillés constamment afin de s'assurer de leur bien-être. L'administration d'anesthésiques sera de rigueur pour toute procédure algogène. Le nombre total de souris, durant les 5 ans du projet, est établi à 1480.

7324 En milieu aquatique, la notion de continuité écologique correspond à la libre circulation des poissons migrateurs et au transport suffisant des sédiments dans les cours d'eau. Elle a été introduite par la Directive Cadre sur l'Eau (2000), comme un élément de qualité pour la classification de l'état écologique. La Loi sur l'Eau et les Milieux Aquatiques (2006) a imposé par la suite (Art. L.214-17 du Code de l'Environnement) le classement de certains cours d'eau, pour lesquels il est nécessaire de préserver et/ou rétablir la continuité écologique.

L'Etat français s'est engagé, via de nombreuses conventions, dans la protection et la gestion des espèces amphihalines à l'échelle internationale. Depuis plusieurs dizaines d'années, des programmes de restauration et de protection des poissons migrateurs (anguille, saumon) existent en France. Assez récemment, l'attention s'est portée sur la problématique de la dévalaison (migration vers la mer) au niveau des aménagements hydroélectriques, leur entrainement dans les prises d'eau puis les turbines étant source de mortalités. L'anguille, espèce en danger critique selon la classification UICN, est particulièrement concernée.

Une des solutions actuellement préconisées en France pour éviter, du moins limiter, l'entrainement des poissons dans les prises d'eau, consiste à mettre en place des plans de grille à faible espacement libre entre barreaux, associés à des exutoires de dévalaison. Alors que les études hydrauliques ont montré la compatibilité de ces dispositifs avec la production d'énergie, leur efficacité biologique in situ, notamment pour l'anguille européenne en dévalaison, reste à valider. Il est ainsi aujourd'hui nécessaire d'acquérir un retour d'expérience sur l'efficacité de ces dispositifs pour valider les critères de conception et vérifier que les plus hautes efficacités peuvent être atteintes.

L'efficacité de telles prises d'eau, dénommées « ichtyocompatibles », est calculée comme la proportion des poissons parmi ceux qui se présentent devant le dispositif, qui sera arrêtée par la grille et rapidement guidée vers les exutoires. Afin d'obtenir un résultat fiable pour différentes configurations d'ouvrages, plusieurs sites doivent être testés. Compte tenu de ces objectifs, de la taille des sites à étudier et du comportement migratoire des anguilles, nous devons recourir à l'usage de la radio-téléométrie. Cette technique permet de suivre à distance les déplacements des poissons durant quelques mois. Les poissons seront marqués, sous anesthésie, avec des marques radio, par insertion chirurgicale dans la cavité abdominale, puis relâchés dans le cours d'eau. Idéalement un suivi de déplacement d'une centaine d'individus au niveau de chaque dispositif de dévalaison est souhaitable pour pouvoir évaluer son efficacité. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, il a été décidé de conduire notre étude sur un tronçon de cours d'eau comprenant quatre sites en série. Ainsi les poissons déversés en amont du tronçon suivi sont susceptibles de passer par plusieurs ou tous les ouvrages étudiés et pourront potentiellement servir à l'évaluation de plusieurs sites. Cependant, des études précédentes ont montré que certains individus arrêtaient leur migration vers la mer. Il est donc nécessaire de relâcher plus d'une centaine d'individus au total, et nombre final de poissons à marquer a été estimé à 200.

7325 Les caprins sont une espèce dont la reproduction est saisonnière. Lors de la saison de repos sexuel, les ovaires de femelles sont au repos et il n'y a pas de cycles ovariens. Il existe néanmoins des moyens d'induire l'ovulation lors de cette période d'anoestrus. Nous travaillons notamment sur l' « effet mâle » c'est-à-dire la capacité qu'à l'introduction d'un mâle sexuellement actif à induire la réactivation de l'axe reproducteur, conduisant au final à l'ovulation lors de cette période de repos sexuel. Les caprins sont un espèce d'intérêt agronomique, l' « effet mâle » peut représenter une alternative à l'utilisation des traitements hormonaux utilisés plus classiquement en élevage pour induire l'ovulation en saison de repos sexuel. L'induction d'une ovulation lors de la saison de repos sexuel permet aux éleveurs de produire du lait tout au long de l'année, c'est donc une pratique très répandue en élevage caprin.

Dans ce cadre, il a été montré que l'odeur du mâle est un stimulus très important pour induire cette réactivation. Notre projet s'intéresse donc aux régulations olfactives impliquées dans ce mécanisme.

Dans ce cadre, nous nous intéressons ici à la manière dont l'ensemble des protéines sécrétées au sein de l'épithélium olfactif peut être influencé par l'introduction du mâle. Ces variations sont d'intérêt car les molécules olfactives volatiles sont en général des molécules de faible poids moléculaires qui se lient à des transporteurs protéiques afin d'arriver au niveau des récepteurs olfactifs. Ces transporteurs permettent le transport des molécules olfactives au sein d'un environnement aqueux et leur disponibilité (ou variation en fonction des situations) peut donc tout à fait être une étape limitante ou cruciale dans la régulation olfactive de l'effet mâle. Ainsi, nous souhaitons ici étudier chez des chèvres en anoestrus, l'expression des transporteurs des molécules olfactives chez les caprins en comparant un groupe de femelles isolées ou en interaction avec un mâle et ce à différents stades suivant l'introduction du bouc. A cette fin, nous utiliserons deux groupes de 8 femelles chacun (soit $n = 16$ en tout). Nous commencerons par vérifier que ces femelles sont bien en repos sexuel par des prises de sang toutes les semaines à partir de début Mai. Puis dans chaque lot, nous effectuerons un prélèvement de mucus nasal. Nous introduirons ensuite deux mâles dans deux sous-groupes de 4 femelles (groupe en contact avec le mâle) tandis que l'autre groupe restera isolé (groupe contrôle) les prélèvements seront répétés à 30 minutes, 6h et 24h après l'introduction du mâle. Les interactions mâle/femelle seront mesurées afin de vérifier la bonne interaction entre les sexes. Le mâle sera ensuite laissé en contact avec les femelles et un prélèvement de sang quotidien sera effectué pendant 15 jours (suivi de l'ovulation).

Ce projet respecte la règle des 3R:

Remplacement: il n'existe pas d'alternative à l'utilisation d'animaux pour évaluer un phénomène aussi complexe. L'effet mâle n'existe pas dans d'autres espèces animales (au moins à ce degré d'étude et de connaissance) que chez les caprins et les ovins.

Raffinement: les animaux seront hébergés en groupes sur paille et bénéficieront d'enrichissement comme des caissons en bois pour grimper dessus et des ballons au sein des parcs d'hébergement. Aucune incidence de l'expérience n'est attendue sur l'état général des animaux. En cas de problème, nous prendrons en compte les signes suivants: perte de poids, prostration, repli social.... Dans tous les cas la décision d'euthanasie sera prise après examen vétérinaire et si les traitements appliqués éventuellement s'avèrent inefficaces (application des points limites).

Réduction: le nombre d'animaux utilisés (2 groupes de 8 femelles) a été limité au minimum tout en permettant une analyse statistique fiable.

7326 L'apprentissage et la mémoire sont des fonctions essentielles du système nerveux. On distingue plusieurs types selon les caractéristiques de ce qui est mémorisé (par exemple informations spatiales ou sensorimotrices) et les régions cérébrales concernées (par exemple hippocampe ou ganglions de la base), mais certains mécanismes moléculaires et cellulaires sous-jacents sont similaires. En particulier les modifications synaptiques jouent un rôle central. La compréhension des mécanismes est un sujet de recherche majeur en neurosciences et a des applications potentielles multiples en médecine pour améliorer ou prévenir les dysfonctionnements pathologiques.

Dans ce projet nous étudions le rôle de la tyrosine kinase Pyk2. Cette enzyme est très exprimée dans les neurones du cerveau antérieur (néocortex, hippocampe, striatum...) et enrichie au niveau des épines dendritiques et des densités post-synaptiques. Elle est activée par le calcium en réponse à la dépolarisation des neurones et à la stimulation des récepteurs NMDA du glutamate. Nous avons produit des souris déficientes en Pyk2, knockout constitutives ou conditionnelles et nous souhaitons tester leurs capacités d'apprentissage et de mémorisation dans deux types de conditions, la mémoire spatiale dépendante de l'hippocampe et des processus de mémorisation dépendants des ganglions de la base (apprentissage moteurs, réponses à la stimulation pharmacologique des circuits de récompense). La stimulation pharmacologique de la libération de dopamine ou le blocage de sa recapture peut entraîner des modifications à long terme des réponses lorsqu'elle est répétée (sensibilisation locomotrice, préférence de place conditionnée). Ces modifications sont un type particulier de mémoire et jouent un rôle dans l'établissement des comportements addictifs.

A long terme ces recherches aideront à comprendre les mécanismes moléculaires du fonctionnement synaptique qui sous-tendent la mémorisation avec des applications dans des domaines aussi divers que la maladie d'Alzheimer ou les addictions.

- Ces expériences seront effectuées chez la souris car il n'existe pas de modèle dans des cultures de cellules ou de modèles informatiques permettant d'étudier le rôle d'une protéine dans l'apprentissage et la mémorisation. L'utilisation d'animaux est indispensable pour évaluer ce rôle.

- Le nombre de souris utilisée sera réduit au strict minimum. Toutefois le nombre de souris inclus dans chaque groupe expérimental doit être suffisant pour que les résultats soient statistiquement significatifs et les résultats reproductibles. Ces expériences seront réalisées dans différentes lignées de souris qui permettent de tester des hypothèses spécifiques et qui fournissent des moyens puissants d'accéder aux mécanismes. Le nombre total de souris qui sera nécessaire pour l'ensemble des expériences est estimé à 1095. Les études biochimiques et histologiques seront réalisées sur des animaux ayant déjà fourni les résultats comportementaux pour réduire le nombre.

- Les animaux seront suivis attentivement et les procédures expérimentales les moins traumatisantes possibles seront utilisées.

Ce protocole a pour but de découvrir les facteurs moléculaires contrôlant la mise en place d'un cerveau fonctionnel. Le bon fonctionnement du cerveau adulte nécessite la formation et le maintien de connexions fonctionnelles et spécifiques entre des types de neurones très variés. Cette organisation ne peut être reproduite par des systèmes cellulaires. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux pour pouvoir comprendre les mécanismes moléculaires permettant le développement du cerveau des mammifères. Le modèle utilisé sera la souris *mus musculus*. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations par des manipulations génétiques à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elles permettent également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines. Le but de notre projet est de déterminer les facteurs moléculaires caractérisant chaque type de connexions excitatrices de la cellule de Purkinje (neurone du cervelet). Une première étape consiste à trouver des marqueurs spécifiques. Pour cela, nous nous basons sur des résultats d'analyse d'expression des gènes comparative pour sélectionner nos candidats. Nous créons ensuite des fusions entre ces candidats et la GFP que nous re-exprimons dans les cellules de Purkinje pour suivre leur localisation subcellulaire. Le nombre d'animaux utilisés dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Nous prévoyons donc l'utilisation d'un total de 100 souris. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif. 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.

7327 Le maintien d'un organe et la régénération tissulaire repose sur l'existence de cellules particulières appelées cellules souches. Ces cellules existent dans les tissus adultes et ont récemment été identifiées dans des "zones de transition". Ces régions représentent la jonction entre deux types d'épithélium et de façon intéressante sont le siège privilégié du développement de carcinomes squameux qui font partie des cancers les plus abondants et agressifs chez l'homme. Par exemple, au niveau du col de l'utérus, les cancers apparaissent exclusivement à la jonction du vagin et de la région cervicale. Dans les cancers de l'anus, les tumeurs présentes dans la zone de transition anorectale sont trois fois plus fréquentes et le pronostic moins favorable que les cancers retrouvés dans le canal anal. Enfin, dans les cancers de l'œsophage la zone de transition entre l'œsophage et l'estomac est souvent affectée. Les connaissances actuelles dans ce domaine sont basées largement sur des études de cas humains et limitées à des évidences descriptives et corrélationnelles ne permettant pas de définir les mécanismes moléculaires impliqués. Nous avons créé des modèles animaux uniques que nous utiliserons pour étudier et suivre les cellules présentes dans les zones de transition. L'hébergement de nos souris se fera en confinement adapté à la stabulation et au travail avec les lignées murines immunodéprimées (Cages individuellement ventilée : sealsafe plus TECHNIPLAST). La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Les locaux d'hébergement et les postes d'expérimentation chirurgicale sont séparés. Les souris de ce projet sont hébergées en groupe (enrichissement social) et un enrichissement complémentaire consistera dans l'ajout de « copeaux compressés » (Nidification). Lors des phases opératoires, outre l'anesthésie durant la chirurgie, en

matière de raffinement nous réaliserons une analgésie péri-opératoire afin d'éviter toute douleur et souffrance.

Nous utiliserons des méthodes alternatives pour valider les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, incluant des méthodes de cultures tridimensionnelles de type organoïdes. Cependant, les cellules placées en culture peuvent changer de propriétés justifiant l'utilisation d'essai in vivo chez la souris pour pouvoir obtenir des conclusions significatives. Ce projet utilisera des souris génétiquement modifiées élevées dans le laboratoire, (360 individus/an) et des souris immunodéficientes de type NOD/SCID (240 individus/an) soit 3000 individus sur 5 ans.

7328 L'arthrose est une maladie dégénérative chronique qui affecte un nombre croissant d'individus au sein de notre population vieillissante.

Actuellement la première ligne de traitement pour l'arthrose comprend des approches telles que la perte de poids ou le traitement thermique. Lorsque ses traitements (non pharmacologiques) deviennent insuffisants, des thérapies pharmacologiques sont utilisées. À ce jour, il n'existe pas de traitement curatif pour l'arthrose chez l'homme, la prise en charge clinique se concentre surtout sur les symptômes de l'arthrose (douleur, l'inflammation), en utilisant des anti-douleurs et des anti-inflammatoires. Cependant, ces approches n'empêchent pas la progression de la dégradation du cartilage et peuvent être associées à des effets indésirables.

C'est pour cette raison qu'un des domaines actifs de recherche consiste à identifier des agents qui pourraient prévenir, retarder ou inverser la pathologie de l'arthrose. Actuellement, le rôle émergent des nutraceutiques pourrait être prometteur dans ce domaine.

Des modèles animaux sont utilisés comme une étape nécessaire dans la démonstration du potentiel protecteur de ces composés sur la santé des articulations.

L'objectif de ce projet est d'étudier le pouvoir anti-inflammatoire d'un nutraceutique administré à différentes doses. Ainsi, après administration orale du produit testé chez les animaux, un agent édémotogène est administré au niveau de la patte arrière et des mesures du volume de la patte sont réalisées durant 24 heures (% d'inhibition de l'inflammation). La dose la plus efficace sélectionnée sera ensuite utilisée lors de tests ultérieurs visant à prévenir ou retarder la pathologie de l'arthrose.

La conception de ce projet (nombre d'animaux, doses sélectionnées et voies d'administrations) est basée sur les informations disponibles issues des études in vitro précédentes (tests préliminaires du potentiel anti-inflammatoire), des données bibliographiques ainsi que sur l'utilisation ultérieure prévue.

Grâce à une bonne standardisation des essais le nombre d'animaux est optimisé tout en évitant de compromettre l'objectif du projet. Ainsi, un total de 68 rats est utilisé au cours du projet pendant 1 an. Le nombre d'animaux a été déterminé en fonction des données déjà disponibles sur la molécule étudiée et en fonction des analyses statistiques réalisées.

L'établissement au sein duquel les animaux sont hébergés fournit des conditions de maintenance adaptées. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'enrichissement pour leur bien-être (ex : litière, matériaux pour nidification...).

Par expérience, ces protocoles ne sont pas susceptibles d'occasionner des douleurs sévères. Toutefois, la surveillance quotidienne "approfondie" de ces animaux assure, si nécessaire, le déclenchement de soins spécifiques sur les conseils d'un vétérinaire. De plus, dans un but de raffinement, l'injection de l'agent édémotogène est réalisée sous une légère anesthésie gazeuse.

L'objectif principal du projet est d'étudier la mise en place du système hématopoïétique, en particulier les cellules souches hématopoïétiques (CSH) au cours du développement embryonnaire, foetal ainsi que son déploiement chez le jeune adulte et la relation entre le système hématopoïétique et le réseau endothélial. Le modèle utilisé sera la souris au travers d'animaux non modifiés et d'animaux génétiquement modifiés afin de permettre l'identification des cellules endothéliales et de leurs dérivés. Les animaux génétiquement modifiés utilisés permettront l'expression stable d'un gène rapporteur par l'utilisation d'une enzyme spécifiquement exprimée par les cellules endothéliales après induction par le tamoxifène. Le potentiel fonctionnel des CSH produites sera définitivement validé dans un test de reconstitution à long terme l'hématopoïèse de souris irradiées, ce test étant internationalement reconnu comme le test de référence, il sera mis en oeuvre sur des populations préalablement testées

in vitro. L'utilisation de la souris est ici entièrement justifiée par sa proximité phylogénétique avec l'homme et il n'existe pas de modèle de remplacement satisfaisant. En application de la règle des 3R, les cellules sont dans un premier temps testées in vitro et seules celles qui ont un réel potentiel CSH sont testées dans l'animal. Le nombre d'animaux (860 souris réparties en 2 protocoles, 560 pour le protocole d'induction par le tamoxifène et 300 pour la reconstitution hématopoïétique de souris irradiées) a été calculé au plus juste afin de lisser les variabilités de réponses individuelles.

L'ensemble des connaissances acquises au cours de cette étude vise à mieux comprendre la génération de CSH et son origine dans des sources non-hématopoïétiques. Elles permettent de dégager des règles cellulaires et moléculaires de production de CSH pour les transposer à des systèmes in vitro qui permettront de reproduire à terme la génération de CSH et contribueront à réduire le nombre d'animaux utilisés. Les souches de souris que nous utilisons permettent de raffiner l'approche et de la cibler aux cellules endothéliales. Nous sommes donc sur le meilleur modèle murin possible par rapport à la question biologique posée.

7329 Le fonctionnement cérébral ainsi que l'ensemble de nos comportements dépendent de la mise en place ordonnée des circuits neuronaux pendant le développement. Des altérations de ces mécanismes, qu'elles soient d'origine génétique ou environnementale, sont en cause dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques, telles que l'autisme ou les pathologies anxio-dépressives. Notre groupe s'attache à caractériser le rôle de la sérotonine dans la construction des réseaux de neurones. Les neurones sérotoninergiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, dont la perturbation est associée à des pathologies anxieuses dépressives et à l'autisme. Les neurones sérotoninergiques se développent très tôt pendant la vie embryonnaire et peuvent influencer de nombreux processus de développement tels que la prolifération des neurones ou la formation des synapses, et par conséquent, les circuits neuronaux qui contrôlent les comportements. L'objectif de ce projet est d'étudier l'implication de la sérotonine dans la construction et le raffinement des circuits neuronaux impliqués dans la mise en place du comportement maternel. En effet, des défauts de comportement maternel ont été observés dans différentes lignées présentant une réduction des niveaux de sérotonine. La souris est un modèle de choix dans ce projet car le comportement maternel de ce petit mammifère est bien caractérisé. De plus, l'analyse des souches de souris génétiquement modifiées nous permet de comprendre les mécanismes neuronaux sous-tendant la mise en place du comportement maternel. Nous nous intéressons à la lignée *Pet1*^{-/-} (*Pet1* est un facteur de transcription impliqué dans l'identité des neurones sérotoninergiques). Le comportement maternel de cette lignée a été décrit comme étant très affecté (perte systématique de toutes les portées), cependant nos observations préliminaires suggèrent que ce défaut n'est pas constant et qu'il implique différents éléments du comportement, allant du désintérêt pour la portée à une mauvaise prise en charge des petits (les petits survivent avec un retard de croissance, qui est rattrapé au sevrage). Nous proposons d'étudier les bases anatomiques cette variabilité comportementale.

Nous anticipons au total l'utilisation de 40 souris pour ce projet.

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Réduction

Nous réduisons le nombre d'animaux en incluant dans une procédure la grande majorité des animaux issus de l'élevage. Ainsi, les couples de reproduction sont choisis de façon à ce que les animaux contrôles proviennent des mêmes portées que les animaux knock-out (KO). De plus, un même animal est utilisé successivement pour des études de comportement, puis pour des études anatomiques.

D'une manière générale, le nombre minimal d'animaux nécessaires à confirmer ou infirmer notre hypothèse de départ, est calculé au plus juste pour chaque expérience (en incluant les groupes contrôles), mais néanmoins suffisants en vue de l'obtention d'une réponse statistiquement valide.

- Raffinement

Les animaux sont maintenus en environnement enrichi et en groupe de 2/3 individus. Seules les femelles gestantes ou avec petits sont transitoirement isolées dans des cages. L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement par du personnel compétent. Pour limiter le stress lors de la

chirurgie, les animaux seront endormis à distance et ne seront amenés qu'au dernier moment dans la salle de perfusion.

- Remplacement

Le comportement maternel étant un comportement social très complexe, le remplacement de l'expérimentation animale n'est ici pas possible.

7330 Les causes génétiques de Cardiomyopathie Dilatée (CMD) sont très nombreuses avec plus de 30 gènes identifiés portant des mutations responsables de la maladie. Cependant, la question des mécanismes liant ces mutations à la maladie reste largement ouverte. Y a-t-il un mécanisme d'action propre à chaque gène conduisant à la pathologie, ou bien y aurait-il une ou quelques voies principales affectées par des groupes de plusieurs gènes?

L'identification, par notre équipe, de BAG3 comme gène de prédisposition à la CMD dans la population humaine suggère la seconde hypothèse. Un mécanisme pathologique commun à de nombreuses CMD passerait par une voie régulée par la protéine BAG3.

La protéine BAG3 est un acteur important dans le processus d'élimination des protéines dysfonctionnelles ou mal conformées ainsi que des agrégats de protéines, et nous avons démontré que des mutations responsables de CMD humaine dans cette protéine entraînent une altération de cette fonction. BAG3 joue donc un rôle critique dans le contrôle de la qualité des protéines et c'est en cela qu'il apparaît prometteur d'évaluer son rôle thérapeutique sur des modèles d'expression de protéine mutées dont l'accumulation est potentiellement toxique pour le cardiomyocyte et qui sont responsables de CMD.

Notre hypothèse est que les mutations CMD dans différents gènes induiraient la synthèse de protéines mutées dont l'accumulation serait toxique pour la cellule (protéotoxicité) quand celle-ci voit ses systèmes d'éliminations altérés (génétiquement ou du fait du vieillissement par exemple). L'injection de virus vecteur de l'expression ou de l'extinction de BAG3 dans le cœur chez la souris développant une CMD d'origine génétique exprimant des protéines potentiellement toxiques permettra de valider cette hypothèse. L'identification d'une voie majeure de la CMD pourrait avoir des conséquences d'un grand intérêt dans la recherche de thérapeutiques contre cette pathologie mais aussi plus généralement contre l'insuffisance cardiaque.

Le projet utilisera 216 souris mâles de deux lignées génétiquement modifiées différentes développant une phénotypie murine de CMD répondant à l'hypothèse d'une cause protéotoxique. Ce nombre est retenu après avoir tenu compte de la règle des "3R" : dans les comparaisons d'effets nous utilisons les tests non paramétriques de Wilcoxon et Kruskal –Wallis pour petits effectifs (Réduire); les procédures douloureuses sont maintenues au minimum (injection d'anesthésique et d'agent thérapeutique ou d'euthanasique (Raffiner)); seuls les animaux injectés exprimant le transgène suivi par imagerie IVIS (indolore), sont conservés pour l'étude longitudinale (Réduire, Raffiner) ; les animaux caractérisés vivants (échographie indolore) sont utilisés pour les analyses post-euthanasies (Raffiner-Réduire). Seul le génotype hétérozygote ou homozygote (selon les lignées) est retenu pour les injections d'AAV (Réduire). Du fait du phénotype cardiaque observé principalement chez les mâles, seuls ceux-ci sont retenus par sexage à 1 jour (Réduire). Le principe de remplacement par des modèles cellulaires est encore limité de nos jours par la grande difficulté à obtenir des cellules musculaires cardiaques adultes dans un contexte physiologique; en effet les cardiomyocytes adultes ne se divisent plus. Les animaux seront injectés avec des AAV thérapeutiques ou contrôles vers l'âge de 3 jours par la veine jugulaire et seuls ceux exprimant les transgènes seront retenus après imagerie fluorescente in vivo (indolore). Les procédures sont indolores ou effectuées sous anesthésie. Les animaux seront euthanasiés en fin d'étude, ou pendant, en cas de souffrance ou pour l'analyse de succès de l'expression des transgènes de façon à éviter de conduire l'ensemble du protocole si les AAV s'avèrent peu efficaces.

7331 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) correspond à un groupe hétérogène de neuropathies périphériques chroniques héréditaires rares avec déficits moteurs et sensoriels. C'est l'un des troubles neurologiques dégénératifs les plus courants qui présente un taux de prévalence "élevé" (prévalence moyenne de 2,63 / 10 000 personnes). La CMT se caractérise par une diminution de la force

musculaire et une fonte des muscles au niveau des extrémités, une déformation du pied, des douleurs musculo-squelettiques et neuropathiques, la perte de dextérité, la fatigue et la perte sensorielle. A ce jour, il n'existe aucun traitement pour inverser ou ralentir le processus de la maladie.

Certaines anomalies génétiques à l'origine de la CMT entraînent la démyélinisation des nerfs périphériques. A chacun des gènes mutés entraînant la démyélinisation, correspond un sous-type de CMT. Le sous-type CMT1A est de loin la forme la plus commune avec 40 à 50% des cas. Le défaut génétique à l'origine de la CMT1A est une duplication de 1.4Mb du chromosome 17p12-p11.2 contenant le gène PMP22 (peripheral myelin protein-22) codant pour une protéine constitutive de la myéline des nerfs périphériques. La surexpression de PMP22 provoque un stress cellulaire aboutissant au dysfonctionnement des cellules de Schwann chargées de la production des protéines de la myéline, ayant pour conséquence un dysfonctionnement des nerfs périphériques associé à des défauts de conduction de l'influx nerveux.

En réponse au stress, les cellules activent divers mécanismes de défense dans le but de contrôler et de réduire le stress cellulaire afin de protéger l'intégrité cellulaire. Dans certaines conditions pathologiques de stress chronique, ces mécanismes de contrôle se retrouvent dans l'incapacité de rétablir l'homéostasie cellulaire ce qui peut conduire à d'importants dysfonctionnements pouvant aller jusqu'à la mort cellulaire.

La souris C3-PMP, modèle murin de CMT1A, est une lignée de souris transgénique qui exprime 3-4 copies du gène PMP22 humain à l'état hétérozygote. Ces animaux montrent les premiers signes de la maladie à 3 semaines et développent une insuffisance neuromusculaire légère associée à une capacité motrice anormale, des défauts de coordination ainsi qu'une hypoactivité. A l'âge adulte, ces animaux montrent une vitesse de conduction nerveuse réduite et stable très similaire à ce qui est observé chez les patients atteints de CMT1A. Ce modèle, au plus proche de la maladie humaine, est donc très pertinent pour la validation de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement de la CMT1A.

L'un des mécanismes activés en condition de stress est l'inhibition transitoire de la synthèse protéique. En parallèle, l'expression d'un panel de gènes spécifiques impliqués dans les mécanismes de défense contre le stress est induite. L'inhibition de la synthèse protéique permet de limiter la consommation en énergie de la cellule et de rediriger les efforts vers la réparation des dommages ou la mise en place de mécanismes de survie. L'expression de GADD34, sous-unité régulatrice de la protéine phosphatase PP1, est stimulée en réponse au stress cellulaire. GADD34 en régulant l'activité de la protéine phosphatase PP1, contrôle la reprise de la synthèse protéique. L'inhibition de GADD34 permet de prolonger l'atténuation naturelle de la synthèse protéique dans les cellules stressées, leur donnant plus de temps pour rétablir l'équilibre cellulaire. Des études de preuve de concept sur deux modèles animaux de CMT ont montré l'efficacité d'un inhibiteur de GADD34 sur les fonctions motrices des animaux ainsi que l'innocuité de cette nouvelle approche thérapeutique, laissant augurer un important potentiel clinique.

Dans cette étude la lignée GADD34DC/DC sera utilisée pour induire une inhibition de GADD34 chez la lignée C3-PMP. Cette lignée exprime une forme tronquée de la protéine GADD34 (délétion de l'exon 3) qui ne peut plus interagir avec la protéine phosphatase PP1. Ce modèle a été utilisé avec succès pour valider GADD34 comme potentielle cible thérapeutique dans un autre modèle de CMT, la CMT1B liée à la mutation d'une autre protéine de la myéline, MPZ.

Le but de cette étude est de développer pour un client un nouveau modèle de souris C3-PMP/GADD34DC/DC (issus du croisement de la lignée C3-PMP avec la lignée GADD34DC/DC) afin de valider génétiquement la protéine GADD34 comme nouvelle cible thérapeutique pour le traitement de la CMT1A et d'évaluer l'impact de l'inactivation de GADD34 sur le développement et la progression de la CMT1A exprimée par les souris C3-PMP. Cette étude entre dans le cadre du développement d'une nouvelle approche thérapeutique pour les patients atteints de CMT1A.

La lignée C3-PMP/GADD34DC/DC sera générée par croisement de la lignée C3-PMP avec la lignée GADD34DC/DC et des lots seront livrés afin d'évaluer chez le client l'impact de l'inactivation de GADD34 sur le développement et la progression de la CMT1A. L'inactivation de GADD34 dans le modèle C3-PMP devrait permettre d'atténuer la progression de la maladie et ainsi améliorer les fonctions motrices et sensorielles de ces animaux. Des souris C3-PMP/GADD34DC/DC, ainsi que des souris C3-PMP, GADD34DC/DC et Wild- type (WT) seront nécessaires à la réalisation de cette

étude. Le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement. Les animaux seront placés dans des conditions optimales de température avec un cycle jour/nuit de 12h/12h, ils auront accès sans restriction à l'eau et à la nourriture et seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié.

Pour pouvoir répondre aux besoins du client et livrer les lots requis pour ses études, nous estimons qu'un total de 1100 animaux sera utilisé dans ce projet (reproducteurs, animaux expédiés et animaux de non intérêt compris).

7332 Les cancers sont un problème majeur de santé publique et font l'objet de nombreux programmes de prévention et de dépistage dans le monde. En dépit des nombreux plans mis en place pour prévenir et traiter les cancers et malgré les progrès de la médecine et des traitements, le nombre de cas de cancer diagnostiqué dans le monde reste considérable. Les principales approches de traitements sont la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, et l'hormonothérapie. Depuis quelques années, l'immunothérapie paraît être une nouvelle option pour limiter le risque de récurrence du cancer. Ceci est rendu possible grâce notamment à une meilleure compréhension de la réponse immunitaire anti-tumorale et du rôle du système immunitaire dans le développement de la tumeur.

En effet, on sait aujourd'hui que la réponse immunitaire est essentielle pour éliminer la tumeur, que ce soit par la réponse innée (cellules NK, cellules présentatrices d'antigènes) ou par la réponse adaptative (lymphocytes T et B). Seulement, de nombreux mécanismes suppresseurs déjouant la surveillance du système immunitaire ont été mis en évidence lors du développement des tumeurs. Ces mécanismes présents physiologiquement deviennent indésirables quand il s'agit d'éliminer les cellules tumorales puisqu'ils régulent le système immunitaire, ce qui conduit à un développement tumoral non contrôlé.

Ce projet vient en complément d'un autre projet étudiant les effets de l'immunothérapie anti-SIRPalpha humain (CD172a), molécule exprimée par les MDSC et macrophages, dans des modèles de cancer chez la souris humanisée- possédant un système immunitaire humain. Cependant, avant de pouvoir tester cette molécule chez l'homme, nous souhaitons pouvoir évaluer sa pharmacocinétique, vitesse d'élimination de la molécule pour une dose donnée (calcul de la $\frac{1}{2}$ vie), in vivo dans un modèle primate dont la physiologie et le métabolisme sont proches de ceux de l'homme.

Ainsi la molécule sera injectée à 3 animaux (4 maximum) à une seule dose, et le suivi de la molécule dans le sang périphérique sera réalisé pendant un maximum d'un mois. Dans un souci de respect de la règle des 3R, les principes de raffinement et de remplacement contribueront à réduire le nombre d'animaux utilisés tout au long du protocole. Ainsi les phases d'étude de l'effet anti-tumoral seront réalisées dans des modèles de cancer chez la souris humanisée. De plus, dès que la molécule ne sera plus détectable dans le sang périphérique des primates, les prélèvements seront suspendus, indiquant la fin de ce protocole. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur des animaux, toutes les procédures de ce projet seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement analgésique sera donné à chacun de façon adaptée en fonction de la procédure. La fréquence d'observation des animaux est doublée lors des expérimentations et consiste en des examens cliniques de l'animal notés sous forme de score clinique selon une échelle préétablie, permettant une prise en charge individuelle et adaptée. Les animaux seront hébergés avant protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental, les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

7333 Les programmes de vaccination dans l'industrie porcine ont apporté une contribution importante dans la santé des animaux et dans l'amélioration de la productivité. L'adjuvant joue un rôle important dans l'efficacité des vaccins porcins, d'autant que les antigènes sont de plus en plus purifiés. Le choix du bon adjuvant a un impact majeur sur la stimulation du système immunitaire, afin de fournir une protection associée un profil d'innocuité approprié. En effet, si leur intérêt a été démontré depuis plusieurs décennies, une meilleure efficacité et une meilleure tolérance sont sans cesse recherchées. Du fait de la complexité du système immunitaire au sein duquel de nombreux organes et acteurs

cellulaires et/ou humoraux sont impliqués, l'expérimentation in vivo reste incontournable. Le modèle souris est la première étape de criblage afin d'analyser l'efficacité et l'innocuité de nouveaux produits. Dans un deuxième temps, il est nécessaire d'évaluer les produits se révélant intéressants, sur animal cible afin de compléter les données immunitaires à partir d'un modèle antigénique pertinent.

Dans ce protocole, l'évaluation de l'immunité des adjuvants chez le porc repose sur l'utilisation d'un vaccin contenant un antigène bactérien inactivé : *Actinobacillus pleuropneumoniae* (APP). L'innocuité sera appréciée par l'observation des réactions locales au site d'injection (échines) après chaque administration (J0 et J28) et par un suivi de la température corporelle. Les injections se feront à l'âge de 42 jours, âge minimal auquel les porcs peuvent être vaccinés contre APP pour éviter une interaction avec l'immunité maternelle. Le protocole standard d'application des vaccins commerciaux contre APP consiste en 1 injection à 6 semaines, et 1 seconde injection à 10 semaines. Nous nous sommes fondés sur ces pratiques de terrain pour choisir l'âge de vaccination. A l'abattage (J110), les échines sont récupérées pour observer directement les réactions tissulaires. L'efficacité du vaccin est réalisée par un suivi sérologique des anticorps spécifiques de l'antigène. Dans ce cadre, des échantillons sanguins seront prélevés à J0, J28, J80 et J110.

Afin de Réduire le nombre d'animaux à utiliser, nous diminuons au maximum le nombre d'animaux par lot (8) et comparons à 2 lots témoins : antigène seul et adjuvant de référence. L'adjuvant de référence est un adjuvant utilisé classiquement chez le porc, dont on connaît les profils d'innocuité et d'efficacité.

Chaque année, nous testerons 3 adjuvants donc il y a aura 5 groupes de 8 animaux par an. Au total, sur les 3 ans, nous aurons testé 9 adjuvants et utilisé 120 porcs de la naissance à 152 jours.

Le Raffinement proposé est basé sur différents points :

- Les conditions d'hébergement : les animaux seront hébergés dans des loges sur caillebotis équipés de chaînes et balles (jouets) avec accès à l'eau ad libitum et nourriture matin et soir. Ils ont accès à une zone de repos propre distincte de la zone d'alimentation.
- La relation homme/animal : afin de diminuer le stress des animaux liés à la contention, les porcelets seront manipulés régulièrement dès leur naissance (caresses, jeux)
- Les interventions seront réalisées dans le calme avec récompense alimentaire.

Toutes les manipulations (vaccinations et prélèvements sanguins), seront effectuées dans un souci du bien-être animal et dans le but de diminuer au maximum la douleur animale.

Remplacer l'utilisation de porcs dans cette expérimentation n'est pas possible puisque c'est pour cette espèce que nous souhaitons identifier l'adjuvant adapté.

Après les tests in vitro, il est nécessaire d'évaluer les produits se révélant intéressants, en fonction de la spécificité et de la sensibilité d'une espèce donnée.

Nous déterminerons le rôle de métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'équilibre glycémique et du poids corporel. Des métabolites dérivés de la flore intestinale ont été associés au diabète et à l'obésité chez l'Homme et dans des modèles expérimentaux chez le rat et la souris par analyse de données de métabolomiques. Nous testerons l'impact d'une supplémentation chronique de ces métabolites issus de la flore microbienne intestinale sur la régulation de l'homéostasie glucidique chez la souris ou le rat. Les objectifs seront donc d'évaluer l'effet des produits de la flore bactérienne sur l'instauration maladies du syndrome cardiométabolique ou sur leur prévention. La supplémentation s'effectuera in vivo par implantation sous cutanée d'une pompe osmotique, qui permet de libérer une solution contenant un métabolite d'intérêt de manière chronique (6 semaines). Concernant la règle des 3R, le projet a été initialement entrepris in vitro sur des lignées cellulaires. Toutefois le métabolisme glucidique est régulé de façon physiologique par un ensemble de tissus producteurs et cibles de l'insuline, qui rend indispensable des explorations in vivo chez l'animal entier. La réduction est prise en compte, n=8 est le n minimum pour avoir des résultats fiables et fins pour le dosage de sécrétion d'insuline effectué par ELISA. Nous passerons le plus de métabolites en parallèle pour réduire le nombre d'animaux des groupes contrôles. En ce qui concerne le raffinement, l'utilisation de pompes osmotiques remplace les injections i.p. ou sous cutanées quotidiennes et réduit donc le stress que représente la contention nécessaire aux injections sur des périodes prolongées. Le volume libéré par les pompes est beaucoup plus faible que lors d'une

injection, puisqu'il diffuse au cours de la journée, et la pompe contient un volume nécessaire pour un traitement chronique sur 6 semaines. Au moindre signe de souffrance, l'expérimentation sera arrêtée. Nous ne multiplierons pas les procédures sur ces animaux. Nous utiliserons 240 souris 129/Sv et BALB/c.

7334 Le traitement ou la prévention des hémorragies chez les patients hémophiles A repose sur l'injection intraveineuse de facteur VIII (FVIII) exogène. Différentes préparations de FVIII thérapeutique existent. La production du FVIII plasmatique fait appel à des procédés extrêmement lourds pour réduire le risque infectieux, et la production de FVIII recombinant est limitée par le fait que le FVIII est l'une des protéines dont les rendements de production sont les plus faibles. De plus, la demi-vie du FVIII dans le sang ne dépasse pas 18 heures, ce qui oblige à traiter les patients au moins tous les deux jours si l'on veut empêcher le développement d'arthropathies. En conséquence, le coût de traitement d'un patient hémophile A sévère dépasse les 50 k€ par an. L'objectif de ce travail est de développer une nouvelle stratégie thérapeutique destinée à remplacer l'injection de FVIII exogène. Celle-ci repose sur l'injection d'ARNm transcrit in vitro (« IVT mRNA ») codant le FVIII. La validation et l'optimisation de cette approche seront réalisées chez des souris déficientes en FVIII, un modèle pré-clinique d'hémophilie A sévère. Le nombre de souris pour ces expériences est déterminé sur la base de prédictions statistiques de manière à être le plus bas possible. Le nombre total maximal de souris estimé pour ce projet est de 108 souris.

Les expériences sont planifiées en accord avec la règle des 3R afin de minimiser le nombre d'animaux : réduction, raffinement et randomisation.

Remplacement : Le projet fera appel à différents modèles expérimentaux chez la souris. En effet, seule une approche expérimentale in vivo permet de rendre compte de la complexité des systèmes biologiques. Toutefois, toute information obtenue par l'expérimentation animale sera immédiatement transposée à des systèmes in vitro pour analyses ultérieures.

Réduction : Nous réduirons le nombre d'animaux par une analyse préalable poussée de la littérature scientifique pour maximiser les approches expérimentales. Des expériences in vitro seront menées en amont pour optimiser les méthodes et diminuer au maximum le nombre d'animaux par lots. Ainsi, des analyses de puissance seront-elles effectuées pour calculer le nombre minimum d'animaux par groupe tout en garantissant la solidité statistique des résultats.

Raffinement : Les souris seront hébergées en accord avec les lois d'éthique européennes. Les animaux seront contrôlés quotidiennement pour évaluer et réduire au maximum tout risque de douleur. Les conditions de vie seront améliorées au maximum (5 souris maximum par cage, ajout de nids végétaux et de tunnels en carton).

La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision. Aucun traitement n'est disponible à l'heure actuelle. Le but de notre étude est de pouvoir proposer une solution thérapeutique aux patients atteints de RP afin de prévenir l'évolution de la maladie. Deux voies de signalisation sont suractivées dans de nombreuses formes de cette maladie : la signalisation calcique et la signalisation GMPc. Notre équipe a développé des outils permettant de limiter cette suractivation : Ca²⁺Sp pour la signalisation calcique et cGSp pour la signalisation GMPc. Nous nous proposons de faire ici de faire une étude préclinique sur des modèles animaux de rétinites pigmentaires pour évaluer si Ca²⁺Sp et cGSp peuvent réduire les effets ou retarder l'évolution de la maladie. Cette étude sera réalisée sur des souris atteintes de rétinite pigmentaire: souris rd1 et souris rd10. Ces 2 modèles sont couramment utilisés par la communauté scientifique dans le cadre d'études menées sur la rétinopathie pigmentaire. Après injection de Ca²⁺Sp ou cGSp à ces souris, nous évaluerons leur potentiel effets protecteur sur la vision des souris à l'aide d'un électrorétinogramme (ERG) en condition photopique (technique non invasive), associé à une évaluation de la présence de photorécepteurs par tomographie en cohérence optique (OCT). Des études histologiques de la rétine seront aussi réalisées sur la rétine de ces animaux.

Au total 300 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Toutes les souris ont à disposition des carrés de cellulose et des bâtons à ronger. 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 ». La fonction visuelle ne peut être évaluée que chez l'animal ce qui ne permet pas une étude exclusivement in vitro. Néanmoins les études préliminaires de développement des outils utilisés seront dans un premier temps mené in vitro. Les animaux utilisés dans cette étude seront surveillés quotidiennement pour vérifier qu'aucun point limite n'est dépassé. Afin de limiter les procédures invasives, nous avons remplacé les injections intraoculaires par des injections systémiques.

7335 Le syndrome de Cohen (SC) est un syndrome rare caractérisé par l'association de nombreux déficits et malformations incluant le développement incomplet du cerveau, une obésité du tronc, des extrémités effilées, une hyperlaxité des ligaments, un retard psychomoteur, une insuffisance dans la production de certaines cellules immunitaires et une perte progressive de la vision. Le SC est secondaire à des mutations du gène VPS13B. La fonction précise de la protéine VPS13B est peu comprise à l'heure actuelle. VPS13B se localise au niveau de l'appareil de Golgi, élément de la machinerie cellulaire nécessaire à la production des protéines. A la suite de mutations dans VPS13B les cellules des patients produisent des glycoprotéines (protéines liées à des sucres) anormales. Les sucres de ces protéines ne sont plus présents en quantité suffisante. Le lien entre VPS13B, ce déficit de glycosylation et les problèmes rencontrés chez les patients reste à comprendre.

Nous souhaitons par l'étude du modèle murin, de souche C57/Bl6J inactivée pour le gène *Vps13b*, déterminer le rôle de la protéine dans la physiopathologie rétinienne du SC. Nous souhaitons plus particulièrement démontrer l'implication de VPS13B dans l'atrophie optique, la dégénérescence des photorécepteurs et la déficience visuelle observées chez les patients atteints du SC. Pour ce faire, nous utiliserons des techniques d'imagerie in vivo et d'enregistrement de l'activité des neurones de la rétine qui sont aussi utilisées chez les patients afin de comparer les données et déterminer la validité du modèle avant d'effectuer des analyses moléculaires. Les techniques d'imagerie et d'enregistrement in-vivo seront effectuées sur du matériel adéquate afin que les procédures soient réalisées dans les meilleures conditions à la fois pour le bien-être des animaux et pour la qualité des résultats obtenus. Ce projet permettra donc de mieux comprendre la rétinopathie de ce syndrome, qui est un handicap majeur chez les patients. Un challenge important est donc de trouver un traitement thérapeutique (pharmacologique ou génique) permettant de prévenir la cécité, et ainsi d'offrir aux patients une meilleure qualité de vie.

La totalité de ce projet utilisera 864 souris sur une durée de 5 ans. Des évaluations statistiques seront réalisées tout au long du projet afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Toujours dans un souci de réduction, les mêmes animaux seront utilisés pour plusieurs analyses lors de ce projet. Dans un but de raffinement, les protocoles utilisés pour les analyses à un âge donné seront si possibles effectués sous une même anesthésie afin d'éviter un trop grand nombre de manipulation ainsi qu'un stress et une souffrance supplémentaire aux animaux étudiés. De plus, afin d'éviter toute souffrance inutile aux animaux, si lors d'une analyse nous observons une cécité bilatérale alors l'animal sera euthanasié avant réveil. Nous tenterons de remplacer certaines études in vivo par la mise en place de cultures de rétines in vitro, sur lesquelles nous espérons pouvoir effectuer des analyses sans avoir à travailler sur des animaux vivants. Il est prévu de faire une analyse rétrospective des souris de cette lignée après chaque année afin de pouvoir déterminer précisément le degré de sévérité de leur phénotype qui est pour l'instant estimé « léger » du fait de la cécité qui est supposée les affecter après plusieurs mois de vie sans toutefois s'accompagner de douleurs. De plus, l'ensemble des procédures expérimentales sont de classe « légère » (techniques non-invasives).

Le rein est le principal responsable du maintien de l'homéostasie du sodium et donc de la volémie et de la pression artérielle. Cette fonction incombe aux segments terminaux du néphron qui ont la capacité de réabsorber une quantité de sodium permettant d'ajuster exactement l'excrétion rénale à l'apport alimentaire journalier. Nous avons récemment découvert que ces segments présentent aussi la capacité de sécréter le sodium ; c'est donc la somme algébrique des quantités de sodium absorbées et sécrétées qui détermine la quantité de sodium excrétée. Le peptide natriurétique atrial, une hormone qui augmente l'excrétion urinaire de sodium, est supposé inhiber les processus de réabsorption dans le néphron distal. Notre récente découverte suggère qu'il pourrait aussi agir en stimulant la voie de sécrétion. Ce projet vise en premier lieu à tester cette hypothèse. Secondairement, nous souhaitons évaluer l'impact d'une charge acide sur ce mécanisme. En effet,

l'acidose stimule les voies de réabsorption de sodium dans le néphron distal sans diminuer son excrétion urinaire, suggérant que la voie de sécrétion pourrait être stimulée en parallèle.

La réalisation du projet nécessitera l'étude de souris C57BL/6J, de souris invalidées pour le gène codant pour la H,K-ATPase de type 2 et de souris transgéniques exprimant l'EGFP spécifiquement dans les cellules intercalaires du néphron distal (souris ATP6v1b1-EGFP).

S'agissant d'étudier un processus physiologique impliquant plusieurs tissus, seuls les modèles animaux permettent de répondre aux questions posées, à l'exclusion de tout modèle cellulaire. Le nombre total d'animaux a pu être réduit à 102 sur la base de nos études précédentes montrant que des groupes de 6 animaux sont suffisants pour atteindre une signification statistique des différences quantitatives attendues. Par ailleurs, chaque animal est utilisé pour réaliser un maximum d'analyses différentes en fin de protocole. Enfin tout sera mis en œuvre pour garantir le minimum de stress et de douleur au cours de l'élevage et de l'hébergement préalable aux expériences (mise en œuvre des procédures d'enrichissement développées par notre centre d'exploration fonctionnelles) et au cours des procédures.

7336 La néphropathie diabétique est une complication majeure du diabète et une des causes principales d'insuffisance rénale terminale en Europe et aux USA. De plus, ce dysfonctionnement rénal est associé dès son stade initial à un risque accru de complications cardio-vasculaires. Cependant, les mécanismes qui sous-tendent cette maladie ne sont pas totalement élucidés.

Il a été montré que le niveau d'expression d'une enzyme particulière (enzyme de conversion de l'angiotensine 1, ECA) dont le niveau est génétiquement déterminé, constituait chez l'homme un facteur de risque de maladies cardiovasculaires et rénales. Afin de mieux comprendre les mécanismes impliqués, nous étudierons les conséquences du niveau d'expression de l'ECA sur la réactivité vasculaire et sur la fonction rénale sur un modèle de souris génétiquement modifié mimant les variations modérées du taux d'ECA observés chez l'homme

Le choix de la souris est justifié par le fait c'est un modèle reconnu en recherche biomédicale. De nombreux gènes sont conservés entre souris et humains. De plus les manipulations génétiques sont plus faciles sur la souris que le rat. Le nombre de souris utilisées dans notre étude a été calculé de sorte à réduire au maximum l'utilisation des animaux afin de respecter la règle des " 3 R ". Afin de garantir le bien-être des animaux une surveillance quotidienne après les procédures expérimentales et le recours à des anesthésiques sont préconisés. Un total de 600 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans.

Le disque intervertébral (DIV) est un tissu fibro-cartilagineux qui joue un rôle essentiel dans la cinématique rachidienne en assurant le rôle d'« amortisseur ». Il est constitué d'un réseau périphérique de fibres de collagène (Annulus fibrosus) qui englobe une structure gélatineuse hautement hydratée (Nucleus pulposus : NP). De façon inéluctable, cette structure subit au cours de la vie un processus de dégénérescence qui s'initie par une altération et une déshydratation du NP. Cette dégénérescence explique environ 40% des douleurs lombaires chez l'homme, faisant de ces atteintes un véritable problème de santé publique.

Face aux nombreuses limites des thérapies existantes, et au regard de l'amélioration des connaissances sur les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ou pluripotentes induites (iPS), la médecine régénératrice offre aujourd'hui de nouvelles perspectives de traitement pour les maladies dégénératives notamment squelettiques.

Dans ce contexte, le projet propose de développer une approche originale de traitement de la dégénérescence discale par la transplantation de cellules régénératrices dérivées de CSM ou d'iPS associé à un biomatériau injectable (HPMC-Silanisé). Il offrira les résultats préalables indispensables avant d'envisager les premiers essais cliniques chez l'homme. Ce projet fait l'objet d'un financement de l'Agence Nationale de la Recherche (projet générique 2014).

Ce projet a pour objectif global de démontrer la faisabilité de l'ingénierie tissulaire du DIV. Plusieurs expérimentations animales se succéderont au cours de ces 5 années d'expérimentations.

Afin de réaliser ces expérimentations, 30 brebis seront nécessaires. Dans un premier temps, des expérimentations porteront sur la faisabilité d'injecter des cellules au sein du DIV et de vérifier la capacité de les suivre dans le temps selon différentes modalités (cellules transgéniques ou cellules

supplémentées en nanoparticules ferromagnétiques). Ces expérimentations seront également indispensables pour la validation des méthodes histologiques et d'imagerie pour la suite du projet. Dans un second temps, la faisabilité et la preuve de concept de la restauration du DIV avec des cellules différenciées et associées seront évaluées. En parallèle, la biodistribution de ces cellules après injection sera également évaluée.

Ce projet est conçu dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : l'évaluation de la dégénérescence discale au cours du temps ne peut être réalisée qu'in vivo d'où la nécessité d'utiliser des animaux. Le modèle ovin est choisi en raison de la grande proximité anatomique entre le rachis de l'Homme et celui de la brebis, autorisant l'utilisation des mêmes matériels pour la voie d'abord chirurgicale.

Réduction : le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur la pertinence de notre approche. Pour ce faire, un suivi in vivo par imagerie (radiographie et IRM) est réalisé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux sacrifiés tout en obtenant des résultats pertinents sur l'état du disque intervertébral lombaire.

Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Tous les animaux auront libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée des expériences. Les animaux seront surveillés tous les jours par les animaliers prévenant rapidement le chercheur et le vétérinaire d'une quelconque anomalie. Une grille comportementale a été mise en place afin d'évaluer la douleur chez l'animal et les critères limites justifiant un arrêt prématuré du protocole et l'euthanasie des animaux. Par ailleurs, l'ensemble des procédures (chirurgie et imagerie) se déroule sous anesthésie générale afin de d'éviter tout stress et toute souffrance.

7337 Au cours du développement de tout nouveau médicament, des études sont requises par les autorités pour évaluer sa sécurité d'utilisation chez l'Homme, rechercher les mécanismes liés à une toxicité éventuelle et proposer des mesures d'accompagnement pour renforcer le bénéfice/risque à utiliser ces médicaments. Ce projet regroupe une partie des études de recherche et développement qui seront conduites chez l'animal en vue de mieux comprendre les effets d'un produit et/ou d'en limiter les impacts chez l'Homme. A ce jour, il n'existe pas, pour ces études, d'alternative complète validée scientifiquement, éthiquement et réglementairement à l'utilisation d'animaux.

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

- Similarité des paramètres cinétiques ou du métabolisme entre l'espèce non-rongeur choisie et l'Homme
- Réponse pharmacologique ou toxicologique spécifique observée seulement chez le primate non humain et l'homme

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

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

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

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

Selon le nombre de candidats médicaments qui nécessiteraient la mise en place de telles études « in vivo », un maximum de 400 rongeurs, 40 lagomorphes, 60 chiens ou 60 singes pourrait être utilisé (dont des animaux réutilisés) sur 4 ans.

7338 L'ostéoporose est une maladie caractérisée par une faible masse osseuse et une altération de la microarchitecture des tissus osseux, ce qui augmente la fragilité osseuse et le risque de fracture chez les personnes atteintes. Le remodelage osseux est un processus dynamique permanent dans lequel s'intriquent la dégradation et la formation de tissu osseux ; la densité osseuse résulte de la balance entre ces deux processus. Dans les cas d'ostéoporose l'activité des cellules responsables de la dégradation osseuse se trouve augmentée entraînant un déséquilibre par rapport à la formation osseuse.

A l'heure actuelle la majorité des traitements ont comme action le ralentissement de la dégradation osseuse, donc une nouvelle solution thérapeutique permettant une formation osseuse associée à une diminution du taux de dégradation est nécessaire.

Par le passé des études in vitro approfondies ont validé l'efficacité et la sécurité de ces molécules. Ces études ont été effectuées sur divers types cellulaires, provenant de différentes origines tissulaires dont les cellules osseuses à différents stades de différenciation. Les résultats obtenus tendent à prouver que ces "compositions pharmaceutiques" peuvent induire une formation osseuse en stimulant la prolifération et la différenciation des cellules impliquées dans la formation osseuse. Ainsi une prise quotidienne de ces molécules innovantes permettrait une action à la fois préventive ou thérapeutique chez des patients ostéoporotiques.

A ce stade, une étude in vivo sur le petit animal est d'une nécessité indispensable pour le futur développement d'une thérapie basée sur ces molécules innovantes. En effet, il n'existe pas de modèle in vitro ou in silico permettant de reproduire la complexité des tissus impliqués dans la réparation osseuse.

Afin de limiter le nombre d'études et donc d'animaux, les molécules testées ici auront été au préalable sélectionnées par une étude d'efficacité sur des modèles cellulaires.

Pour évaluer le pouvoir thérapeutique de nos molécules, cette étude se fera sur deux modèles ; Des rats ostéoporotiques dont la perte osseuse est induite par une ovariectomie bilatérale. Ce modèle est communément utilisé pour les études précliniques en raison de sa perte osseuse rapide et très reproductible faisant suite à la déficience en œstrogène.

Et un modèle de rats contrôle ayant subi les mêmes conditions d'opération mais sans ovariectomie. Ces rats contrôles permettront d'estimer la densité osseuse chez un rat sain au cours de l'étude. La densité et l'architecture osseuse seront évaluées après traitement par CT scan haute résolution.

Pour cette étude, le nombre total de rats nécessaires sera dépendant du nombre de conditions testées. Deux molécules, sélectionnées en amont par des études in vitro, seront évaluées et le nombre d'animaux par groupe sera réduit au maximum sans nuire à une interprétation statistique de nos résultats, c'est à dire 8 rats par groupe. Au total le projet utilisera 96 rats.

Les animaux seront hébergés 2 par cage pour permettre un enrichissement social. Et dans chaque cage, la présence de copeaux et une structure de jeux permettront l'expression des comportements de fouissage.

Afin de diminuer le stress lié à la manipulation et à la brève contention lors du traitement, les animaux auront une phase d'habituation de 7 jours, où les expérimentateurs les manipuleront quotidiennement.

L'état général des animaux sera contrôlé par une observation régulière ; En cas de douleurs apparentes caractérisées par un mauvais état général de l'animal (perte de poids, pilo-érection, isolement social, déshydratation) les animaux seront traités avec un analgésique 2 fois par jour pendant 2 jours.

En cas de douleurs persistantes observées, et cela malgré les traitements analgésiques entrepris, l'animal sera euthanasié prématurément.

7339 Les Occlusions de Branches Veineuses Rétiniennes (OBVR) sont - après la rétinopathie diabétique - la seconde cause la plus fréquente de perte de vision dans les rétinopathies vasculaires.

Quand une veine rétinienne est occluse, le flux sanguin stagne, la pression veineuse augmente et le sang est drainé à travers les capillaires et veines des quadrants voisins. La veine occlue se dilate en amont de son occlusion, devient tortueuse, et des œdèmes et hémorragies se produisent. En aval de l'occlusion, la rétine, insuffisamment irriguée, souffre par manque d'oxygène. Deux phénomènes sont responsables de perte de vision : le ralentissement circulatoire et l'œdème rétinien ou maculaire.

L'occlusion veineuse peut être expérimentalement induite par photocoagulation laser qui entraîne des lésions similaires à celles observées chez l'homme. Ce modèle est bien décrit chez le rat et les modifications vasculaires sont précisément décrites grâce à l'angiographie en fluorescence du fond d'œil.

Les péricytes sont des cellules localisées à la surface des vaisseaux sanguins avec des fonctions clés dans la stabilisation des vaisseaux, la régulation du flux sanguin, la formation et le maintien de la barrière rétinienne sanguine (étanchéité des vaisseaux).

Notre hypothèse est qu'au cours de l'occlusion veineuse, les péricytes dysfonctionnent ou meurent, entraînant d'importantes lésions neuro-vasculaires dans la rétine, et une perte de vision. Nous souhaitons décrire ces dysfonctionnements qui sont encore très mal connus, de façon à identifier des traitements qui permettraient, en les protégeant, de préserver la fonction visuelle au cours des occlusions veineuses.

Nous identifierons les gènes qui sont différentiellement exprimés dans les neurorétines de rats soumis à une OBVR expérimentale par rapport à des rétines normales. Nous marquerons l'expression de molécules du stress oxydant et de l'inflammation et nous déterminerons de quelle façon meurent les péricytes dans ce modèle. Ces analyses seront faites à différents temps après l'occlusion. Nous évaluerons les effets de l'injection intra-oculaire de 2 molécules dont notre équipe a démontré les propriétés neuroprotectrices pour la rétine. Pour cela, nous utiliserons 130 rats (*rattus norvegicus*) afin de suivre les modifications à des intervalles de temps différents après induction de l'OBVR, avec ou sans injection de la molécule neuroprotectrice.

Avant ces études *in vivo*, nous étudierons le comportement des péricytes en culture, en conditions standard ou soumis à une ischémie. Nous caractériserons les réponses physiopathologiques de ces cellules. Cette étape permettra de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Lorsque les examens sont indolores et non invasifs, nous en effectuerons plusieurs sur les mêmes animaux de façon à en utiliser moins, au cours d'une même anesthésie, ou au cours de 2 anesthésies si le vétérinaire l'autorise. Les appareils perfectionnés que nous utilisons permettent d'analyser l'œil sous une anesthésie sans nécessiter l'euthanasie de l'animal. Toutes nos procédures seront effectuées sous anesthésie générale et locale. Nous emploierons des tests statistiques non paramétriques de façon à ce que le nombre d'animaux par groupe soit moins important. Les cages d'hébergement des animaux sont enrichies ; ils ont 1 semaine pour s'adapter à leur environnement avant le début du projet. Le projet dans son ensemble nécessite l'utilisation de 130 animaux.

7340 Ce projet a pour objectif de trouver des indicateurs métaboliques traduisant la prédisposition des individus à grossir et/ou à développer un diabète lorsqu'ils sont soumis à un régime gras et sucré. Ces nouvelles connaissances doivent permettre d'apporter des conseils nutritionnels aux individus à titre préventif.

Nous mettons à l'épreuve l'hypothèse que certains marqueurs du métabolisme chez le sujet encore jeune, en bonne santé et de poids normal, peuvent révéler le risque d'une prédisposition à développer du surpoids et du diabète en réponse à des régimes alimentaires inadaptés à leur physiologie. A cette fin, les marqueurs du métabolisme seront étudiés chez des groupes d'animaux soumis soit à un régime à faible teneur en graisse, mais déjà caractérisé comme pouvant induire une obésité viscérale du fait d'une digestion rapide des glucides conduisant à une vitesse d'absorption rapide du glucose, soit à un régime classiquement reconnu comme étant la cause d'une prise de poids accrue et du développement de diabète, le régime dit « occidental », c'est-à-dire à la fois riche en sucres et en graisse auquel beaucoup d'entre nous, et plus particulièrement les classes sociales ayant des revenus limités, sont confrontés tous les jours.

Ce projet de recherche, réalisée sur un modèle animal (le rat), doit permettre d'identifier chez les sujets à risque, avant le développement d'un surpoids et/ou de diabète, certains facteurs clefs tels que i) le type de microbiote intestinal, ii) l'identification de biomarqueurs du métabolisme dans les urines, iii) la sensibilité à l'insuline et les variations des taux sanguins de glucose et d'insuline en réponse à un repas test, et enfin iv) les paramètres de la dépense énergétique (métabolisme basal, activité motrice spontanée, coût du mouvement et thermogénèse alimentaire).

L'évolution de la prise alimentaire, du poids et de la composition corporelle sera mesurée en réponse à des changements de composition de l'aliment. Elle ne peut donc être réalisée que sur des animaux maintenus dans des conditions d'hébergement leur permettant de décider librement de leur prise alimentaire. Dans ce contexte, le choix du rat s'impose, dans la mesure où son régime et son comportement alimentaire présentent de grandes similitudes avec celui de l'homme. L'étude comprend 96 rats au total réparti en 4 lots de 24 rats car nous testons 2 conditions nutritionnelles différentes (régime non gras, régime gras/sucré), et 2 conditions d'hébergement distinctes (en groupes de 4 par cage et en cages individuelles). Ce nombre est le strict minimum requis pour permettre de révéler des différences statistiquement significatives étant donné le type d'analyse statistique imposé par le projet (analyse de la variance).

Le protocole a été optimisé pour réduire le nombre de rats à intégrer dans l'étude, en particulier en réalisant séquentiellement sur les mêmes individus les mesures des différents marqueurs métaboliques d'intérêt.

La procédure expérimentale n'implique pas de manipulation susceptible d'induire une souffrance physique significative sur les rats de l'étude. Par contre, pour permettre la mesure de la prise alimentaire et éviter une contamination du microbiote intestinal entre les individus, il est nécessaire de maintenir une moitié des rats en cage individuelle pendant l'étude. Dans la pratique, nous essayons de limiter le stress induit par cette procédure en hébergeant les rats dans des cages de plexiglass qui leur permettent de se voir et de se sentir. Toutes les cages sont également enrichies de « jouets » et de niches. L'autre moitié des rats, maintenue en cages collectives, permettra de vérifier si ce type d'hébergement induit (ou non) un échange de microbiotes entre rats partageant la même cage et permettra (ou non) à l'avenir de maintenir les rats en cages collectives pour réaliser ce type d'étude.

Les critères pour décider de la sortie de l'étude d'un animal sont très stricts, d'autant plus que cette étude vise entre-autre à mesurer l'évolution normale du poids et de la prise alimentaire sous différents régimes et que ces paramètres sont immédiatement perturbés si l'animal n'est pas en bonne santé. En plus de ce critère très sensible, les critères fondamentaux tels que l'état général, prostration, poil hirsute, perte de poids anormale dans le contexte expérimental (supérieure à 10% en 3 jours), diarrhée, déshydratation, sans récupération seront utilisés.

7341 Ce projet de 5 ans pour la recherche fondamentale vise à comprendre la façon dont le cerveau représente l'espace et utilise ces représentations pour l'action. Parmi les questions centrales que nous abordons, se trouvent les questions des bases neurales de l'attention et de la perception. Les questions que nous posons se déclinent sur 4 grands axes principaux.

1er Axe :

Compréhension de la construction d'une représentation interne de l'espace et du soi dans cet espace par les différentes modalités sensorielles.

2ème Axe :

Compréhension de la mise en œuvre de l'attention par le cerveau à différents niveaux.

3ème Axe :

Compréhension des signaux d'orientation de l'attention et applications thérapeutiques chez des patients pauci-relationnels et mise en évidence d'une connectivité anatomique entre des aires définies au préalable.

4ème Axe :

Contrôle et orientation des mécanismes dynamiques et plastiques de façon à maximiser l'apprentissage ou les mécanismes de réparation fonctionnelle.

Compréhension des bases neurales de la cognition spatiale et de l'action.

Ouverture à de nouvelles directions pour la réhabilitation des déficits de la cognition spatiale, observées suite à des lésions corticales aiguës.

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons des techniques classiques non invasives dans le cadre du raffinement nous utiliserons de l'IRMf, et des électrodes à plus haute densité seront utilisées de façon à réduire le temps d'expérimentation avec les animaux.

Nous enregistrons les potentiels d'action des neurones et de champs de potentiels locaux, multi-électrodes, multi-sites, et des modulations pharmacologiques locales. Cette recherche vise à la fois à augmenter notre compréhension des bases neurales de la cognition spatiale et de l'action, et à ouvrir de nouvelles directions pour la réhabilitation de déficits de la cognition spatiale, observées suite à des lésions corticales aiguës, ou encore suite à des troubles neurodégénératifs ou neurodéveloppementaux.

Le projet combinant analyse du comportement et injections pharmacologiques intracérébrales ou enregistrements électrophysiologiques, il sera réalisé chez le primate non humain, le seul modèle animal doté d'un système visuel comparable à celui de l'Homme et capable d'effectuer des tâches aussi complexes que celles réalisées par l'Homme. Des techniques alternatives comme les cellules en culture ou la simulation informatique ne peuvent pas encore remplacer l'utilisation de l'animal pour nos travaux car à l'heure actuelle, elles ne permettent pas d'atteindre le niveau de complexité requis pour l'étude de fonctions cognitives aussi complexes.

Ce projet complexe requiert des animaux pouvant effectuer des tâches actives, ce qui est très difficile à obtenir. Nous utiliserons 18 macaques Rhésus au maximum. Chacun des animaux ne subira pas la totalité des procédures, mais celles concernées pour la réalisation de la partie du projet qui le concerne et sert également comme son propre contrôle. La sévérité du projet est modérée pour les animaux, à la fin du projet ils pourront être intégrés dans un nouveau projet ou seront inscrits dans une démarche de remplacement en sanctuaire.

Enfin, nous sommes particulièrement attentifs au bien-être de nos animaux et veillons à ce que leurs apprentissages se fassent de manière positive en les récompensant avec des friandises et des jouets. Des points limites sont définis en amont de l'étude et chaque animal sera observé régulièrement pour contrôler ces derniers.

7342 Il s'agit d'évaluer sur des modèles de rongeurs la biocompatibilité (réaction inflammatoire, réaction à corps étranger, fibrose, vascularisation, persistance ou dégradation du matériau, persistance ou disparition des cellules, intégration au tissu hôte) et éventuellement la fonctionnalité (formation osseuse ectopique, vascularisation) de produits d'ingénierie tissulaire comportant des cellules humaines ou des tissus ou produits d'origine humaine, destinés à la régénération de lésions tissulaires graves. Du fait du risque de réaction de rejet des éléments greffés par l'hôte, nous utiliserons des rats et souris immuno-déficients pour ces études. La majorité des expériences seront conduites à l'animalerie conventionnelle, mais les expériences mettant en œuvre l'implantation de cellules humaines et utilisant des animaux immuno-compromis se dérouleront à l'animalerie A2. L'implantation

en site sous-cutané est le test de biocompatibilité in vivo de première intention, car il est simple à mettre en œuvre, recourt à une chirurgie très légère, engendre une douleur opératoire ou post-opératoire très faible, de très rares complications post-opératoires (infection au site de l'incision) qui peuvent être facilement traitées si elles surviennent (nettoyage par antiseptique local). Ce modèle permet de réaliser un suivi longitudinal de certains paramètres du fait de sa position très superficielle: visualisation et mesure de fluorescence ou de luminescence (cellules exprimant des gènes de protéines fluorescentes ou la luciférase ; utilisation de colorants fluorescents pour marquer des protéines ou des matrices synthétiques...), microtomographie de rayons X...Enfin, en fonction des matériaux étudiés, il est possible de réaliser au moins deux implantations par animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux et d'avoir dans le même animal une condition expérimentale "contrôle" et une condition "test". Les études effectuées nécessiteront l'euthanasie des animaux pour procéder à des analyses histologiques. Le choix des dates d'euthanasie sera limité à des temps classiquement décrits dans la littérature comme permettant la mise en évidence de l'inflammation aiguë (7 jours), de la formation de corps étrangers (14 jours) et de la fibrose (21 jours). Un temps plus long, pouvant aller jusqu'à 60 jours, sera utilisé pour mettre en évidence un processus biologique ou une fonction générée ou apportée par le biomatériau ou le dispositif implanté. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque matériau et chaque temps expérimental sera de 8. Ainsi, pour une expérience complète (deux conditions expérimentales dont une condition témoin) impliquant 4 temps et 8 animaux par temps, le nombre total d'animaux sera de 32.

Remplacement, réduction, raffinement: Le remplacement n'est pas possible puisque la biocompatibilité implique des réactions multiples et complexes de l'organisme, qui ne peuvent être reproduites in vitro. Le nombre d'expérimentations sera réduit par les mesures suivantes: ne seront testés in vivo que les matériaux ayant démontré in vitro une absence de cytotoxicité ; le développement de nouvelles méthodes d'imagerie non invasive (fluorescence, bioluminescence) permettant notamment d'évaluer la vascularisation, l'inflammation et la formation osseuse, à l'aide de sondes moléculaires spécifiques, et grâce à l'utilisation d'appareils de bioluminescence et de fluorescence, permettra de réduire très significativement le nombre d'animaux, en permettant de définir les temps pour lesquels une étude fine par histologie, nécessitant l'euthanasie de l'animal, est judicieuse. Raffinement: la possibilité d'implanter au moins deux matériaux par animal, de réaliser un suivi longitudinal, d'analyser plusieurs paramètres à partir des mêmes prélèvements sur animaux après euthanasie, permet de collecter un maximum d'informations sur les animaux utilisés.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 1000 souris et 120 rats. Cela concerne une partie importante de l'activité de 4 chercheurs ou enseignants-chercheurs (30% de la durée consacrée à leurs projets).

Les procédures liées à l'imagerie sur animal vivant feront l'objet d'une saisine séparée.

7343 L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies touchent environ 1 garçon sur 3500 pour la dystrophie de Duchenne (DMD) et 1 personne sur 50 000 pour les LGMD. Elles sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. La morbidité de ces pathologies est associée à des atteintes cardiaques ou respiratoires. L'atteinte cardiaque la plus fréquente se présente sous la forme d'une cardiomyopathie dilatée (DCM) qui est caractérisée par une dilatation ventriculaire accompagnée d'une réduction de la fonction systolique. Plus de 72% des patients adultes atteints de DMD et 1 personne sur 3000 dans la population générale présentent une DCM. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Dans ce projet, nous souhaiterions caractériser la fonction cardiaque avant/après traitement de modèles murins de dystrophies musculaires et présentant une atteinte cardiaque. Il s'agit notamment de souris déficientes, soit en dystrophine, soit en dysferline, soit en alpha-sarcoglycane, soit en gamma-sarcoglycane, soit en titine, soit en FKRP; les modèles contrôlent (au nombre de deux) correspond au fond génétique de ces animaux seront également inclus. Pour cela, dans un souci de raffinement, nous souhaitons réaliser une induction d'un stress cardiaque par des molécules inotropes (dobutamine/isoprénaline), connues pour induire une contractilité accrue du myocarde, ce qui permet

une meilleure évaluation des atteintes cardiaques. La fonction cardiaque est ensuite monitorée par échocardiographie. Cette approche a pour but de mimer et d'évaluer la fatigabilité du cœur similaire à un exercice et évite ainsi d'imposer aux animaux des tests physiques.

L'échocardiographie de stress induite par Dobutamine est couramment utilisée en clinique, notamment pour des investigations d'ischémie, d'évaluation de maladies valvulaires et de mesure de la viabilité et de la contractilité du myocarde. Cette méthodologie est depuis quelques années utilisée sur le petit animal (rongeurs) avec des résultats d'imagerie de qualité. L'échographie de stress permettra ainsi d'évaluer l'efficacité de l'utilisation d'un traitement (transfert de gène ou molécule pharmacologique) sur la correction de la pathologie dans les modèles animaux. Notamment, une approche quantitative de l'évaluation de la fraction d'éjection sera utilisée pour déterminer l'efficacité des différents traitements. L'ensemble de cette étude devant se réaliser dans un contexte in vivo afin d'évaluer la physiologie de l'animal, mimant au plus proche la condition clinique observée chez l'homme, le modèle souris est utilisé car celui-ci est le plus adapté pour répondre à notre problématique. Le critère de remplacement n'est pas applicable à ce type d'études.

Les approches de transfert de gène et les approches pharmacologiques peuvent contribuer à corriger la pathologie dans des modèles reproduisant les défauts génétiques et les signes de la pathologie humaine de ces différentes dystrophies musculaires. Pour les approches pharmacologiques, nous utiliserons des molécules pharmacologiques dont l'innocuité a précédemment été démontrée. Pour les approches de transfert de gène, nous utiliserons des vecteurs contenant du matériel génétique ciblant le gène déficient ou ciblant les voies identifiées comme impliquées dans les DCM et dont l'efficacité thérapeutique locale et globale aura déjà été démontrée par des études préliminaires.

Les modifications génétiques présentes dans le génome des modèles utilisés n'ont pas d'impact sur l'activité naturelle de la souris qui ne présente donc pas de phénotype dommageable. Dans un souci de réduction, avant de réaliser les études d'efficacité de traitement, nous réaliserons des analyses du transcriptome afin de nous assurer que la voie que nous voulons cibler est bien perturbée dans le modèle considéré. Par ailleurs, l'échographie de stress permet d'effectuer l'ensemble des études fonctionnelles de façon longitudinale sur les mêmes groupes d'animaux.

Dans ce projet, nous estimons que 270 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction des connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats dans le but d'obtenir les résultats les plus robustes en impliquant le moins d'animaux possible.

7344 Le système du complément fait référence à un ensemble de protéines sériques qui coopèrent à la fois avec l'immunité innée et adaptative pour éliminer les pathogènes. Depuis longtemps, le système du complément a été considéré comme étant une première ligne de défense immunitaire contre le cancer en s'activant à la surface des cellules tumorales. Cependant, les cellules tumorales développent des mécanismes induisant une inhibition de la voie terminale de la cascade du complément en échappant ainsi à l'effet cytotoxique médié par ce système. De récentes études ont démontré que l'activation du complément au sein du microenvironnement tumoral peut promouvoir le développement de cancer. L'activation du complément peut induire un état d'inflammation chronique, favoriser un microenvironnement immunosuppresseur, stimuler l'angiogenèse et activer des voies de signalisations favorables au développement tumoral. Les mécanismes liés à ces phénomènes sont encore mal compris. L'objectif de ce projet est d'analyser in vitro et in vivo le rôle du complément dans le développement tumoral. Nous aborderons ces questions par des études sur des modèles cellulaires in vitro et in vivo par des études de développement tumoral. Nous disposerons de souris C57bl/6 wild type et invalidées pour les gènes de C1q, C4 ou C3. Les résultats de ce projet permettront l'identification de cibles thérapeutiques parmi les composants du système du complément. Toutes les expérimentations seront anticipées à l'avance et l'application des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respecté dans ce projet. L'enrichissement du milieu sera également mis en place. Les expériences in vitro utilisant des lignées cellulaires tumorales ont été réalisées et utilisées pour la mise en place visant à réduire le nombre d'animaux à utiliser dans ce projet d'expérimentation. Les applications in vitro ne permettent pas de répondre entièrement à nos objectifs car des cellules isolées ne peuvent refléter la complexité du système immunitaire, de la vascularisation et du microenvironnement tumoral. L'expérimentation animale est ainsi nécessaire afin d'étudier ces interactions complexes au

sein d'une tumeur et de chercher des cibles thérapeutiques. Les souris ont été choisies comme modèle expérimental car il existe différentes lignées génétiquement modifiées pour les protéines du complément notamment C1q, C4 et C3. Des analyses statistiques ont été effectuées afin de déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Chaque expérimentation sera raffinée afin d'obtenir un maximum de résultats de chaque animal (taille tumorale, infiltrat immunitaire, prélèvement de la tumeur et de la rate, présence de métastases et prélèvement sanguin). Ce projet d'une durée de 5 ans nécessitera l'utilisation de 1290 souris.

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. Dans ce contexte nous cherchons à réaliser une carte détaillée de la connectivité anatomique entre le cervelet et l'hippocampe en combinant des injections stéréotaxiques de traceurs rétrogrades et antérogrades. Nous prévoyons d'utiliser au maximum N= 144 animaux.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : Pour la réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum puisqu'un maximum de n=4 animaux est prévu pour chaque combinaisons de traceurs/régions cérébrale injectée. Pour le raffinement, les animaux seront hébergés en groupe de 2 à 5 animaux, dans un environnement à température contrôlée, avec cycle diurne-nocturne de 12h. L'eau, la nourriture seront fournies ad libitum et un nid végétal est placé dans chacune des cages de manière à offrir aux animaux un minimum d'enrichissement. Au cours de la chirurgie nous mettons en place les procédures nécessaires pour garantir le bien-être de l'animal et le prévenir de toute douleur et angoisse. Enfin, pour le remplacement, ce projet qui vise à étudier les liens anatomiques entre le cervelet et l'hippocampe fait partie d'un projet plus globale dans lequel nous étudions la mémoire spatiale et la navigation. Ces comportements complexes ne peuvent être étudiés in vitro ou sur animaux invertébrés c'est pourquoi nous utilisons le rongeur qui est une des espèces les plus appropriées pour ce type d'étude.

7345 Notre Master forme des étudiants aux métiers de la Recherche en Biologie. Dans le cadre de la progression pédagogique de ce Master, la physiologie du système cardiovasculaire revêt une importance de premier ordre tout comme les méthodes de culture primaire et de tests in vitro. C'est pourquoi dans le cadre des travaux pratiques de ce master, nous avons choisi de mettre en œuvre une culture primaire de cardiomyocytes. Cette culture primaire nous permettra d'étudier les effets de l'hypoxie sur les cellules cardiaques et de comprendre les conséquences sur le système cardiovasculaire. La mise en culture primaire de ces cardiomyocytes isolés à partir de cœurs de rats permettra aux étudiants de mettre en œuvre les grandes étapes d'une culture primaire (dissociations des cellules, purifications du type cellulaire désiré, test de viabilité, mise en culture). Le modèle de cardiomyocyte présente en outre l'avantage d'être très visuel et par conséquent très pédagogique. En effet, la qualité de la culture primaire et plus précisément l'état physiologique des cellules peut être apprécié rapidement et facilement au microscope en observant la fréquence des contractions des cardiomyocytes.

Les cardiomyocytes seront extraits et purifiés à partir de cœurs de rats âgés de 3 à 5 jours. Le choix du cardiomyocyte de rats est justifié parce qu'il s'agit d'un modèle de référence. De plus, l'extraction de cardiomyocytes fonctionnels en grand nombre ne peut être réalisée qu'à partir de rats. En effet, l'utilisation de rats adultes entraîne une baisse significative du nombre de cellules viables nécessitant l'utilisation d'un nombre d'animaux beaucoup plus important.

Ces travaux nécessiteront l'utilisation d'un nombre total de 20 rats (10 rats /an). En effet, l'adaptation des tests in vitro qui seront réalisés après la mise en culture (suivi de la fréquence de battements, de la survie cellulaire, étude de la dépolarisation de la mitochondrie), nécessite environ 20 millions de cardiomyocytes pouvant être obtenus à partir de 10 cœurs.

L'élevage des animaux et l'ensemble des expérimentations seront réalisés dans le respect des textes réglementaires relatifs à la protection et à l'utilisation des animaux de laboratoire. Le projet s'inscrit dans une démarche éthique suivant la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) en optimisant les

conditions de vie, d'hébergement et de soins des animaux et en tenant compte de la sensibilité des animaux ainsi que des contraintes liées à l'espèce. Ce projet tient compte des points limites et de la prévention de la douleur afin d'assurer l'absence de douleur et de favoriser le bien-être des animaux tout au long de leur vie.

Le protocole qui sera utilisé pour l'euthanasie des animaux sera celui de référence.

Nous avons démontré les effets bénéfiques sur la régénération musculaire d'une molécule. En effet lors de l'injection de cette molécule à des animaux blessés, la régénération s'est passée plus rapidement. Cette molécule a également démontré un effet bénéfique dans un modèle de dystrophies musculaires la maladie de Duchenne. Ainsi les animaux malades traités ont montré à l'échelle des tissus moins d'inflammation et moins de nécrose. Cette molécule est utilisée de façon courante dans la pratique médicale mais pour d'autres applications.

A présent nous souhaitons modifier la molécule afin d'en améliorer l'adressage (qu'elle aille dans les tissus d'intérêt) et éventuellement d'en améliorer l'efficacité. Nous souhaitons également voir l'effet de cette nouvelle molécule sur les autres tissus et organes.

Nous avons d'ores et déjà nos molécules candidates (au nombre de 10) et allons les tester par injection aux souris afin de constater leur implication éventuelle dans une meilleure régénération.

Afin de répondre à ces questions nous allons utiliser des souris qui sont un bon modèle pour la régénération musculaire et la maladie de Duchenne. Nous limiterons le nombre d'animaux en exploitant un maximum les cohortes injectées (nous coordonnerons plusieurs laboratoires afin qu'à partir d'un animal tous les organes soient prélevés) et nous ferons, lorsque c'est possible les tests de nos molécules in vitro directement sur les cellules souches. 7 souris seront utilisées par molécule soit 84 animaux. Il y a 2 modèles différents d'étude (régénération après blessure et régénération chez un modèle de dystrophies) soit 168 animaux. Nous aurons une sévérité modérée, les animaux étant analgésiés et étroitement surveillés après des procédures bien maîtrisées. Bien que chimiquement modifiées ces molécules sont bien connues, et n'entraînent aucun effet secondaire chez l'Homme. Ces molécules sont utilisées quotidiennement en clinique et les modifications apportées à la structure chimique sont mineures et nous n'attendons pas de dommages particuliers. Nous porterons une attention toute particulière durant la période de traitement au bien-être animal.

Si nos expériences sont concluantes et découvrons une molécule ayant des effets positifs sur le modèle dystrophique, cela nous permettra de rapidement entrer en phase d'essais cliniques dans le cadre de la pathologie de Duchenne qui aujourd'hui n'a aucun traitement.

7346 Les bactéries *Propionibacterium freudenreichii* (PF) sont utilisées comme levain dans la fabrication de l'emmental. Des propriétés de modulation de l'immunité de l'hôte de certaines souches de PF ont déjà été démontrées, suggérant que ces bactéries alimentaires pourraient servir de probiotiques. Les propriétés de modulation de l'immunité seraient liées à l'expression de protéines à la surface de ces bactéries. Des données de digestion in vitro montrent que ces protéines de surface pourraient être sensibles à la digestion gastro-duodénale. Une vectorisation de ces bactéries pour les protéger de cette phase de digestion semble donc nécessaire pour préserver les propriétés probiotiques de ces bactéries. L'objectif principal de ce travail est d'évaluer l'impact de deux stratégies de vectorisation (fromage et encapsulation/séchage dans du lactosérum) sur la résistance des protéines de surface à la digestion gastro-duodénale in vivo dans un modèle animal et in fine sur les propriétés immuno-modulatrices d'une souche particulière de bactérie PF.

Pour cela 24 porcelets âgés de 6 semaines seront logés en cages individuelles et recevront les bactéries PF par gavage orogastrique quotidien pendant 2 semaines. Les bactéries PF seront soit directement suspendues dans une solution physiologique, soit contenues dans un fromage qui sera broyé et resuspendu dans une solution physiologique, soit séchées par atomisation en présence de lactosérum et resuspendues dans une solution physiologique. Seize autres porcelets, également logés en cages individuelles serviront de groupe témoin. Ils recevront soit du fromage stérile broyé et resuspendu dans une solution physiologique, soit du lactosérum stérile séché par atomisation et resuspendu dans une solution physiologique. Pendant ces deux semaines, des prélèvements de fèces seront réalisés régulièrement pour y quantifier la présence des bactéries PF. Après deux semaines, les animaux seront euthanasiés et divers tissus (sang, ganglions mésentériques, contenus

intestinaux) seront prélevés pour évaluer les propriétés immuno-modulatrices de ces traitements et la présence de protéines de surface dans les contenus intestinaux.

Ce projet respecte la règle des 3R. En effet, ce protocole qui vise à évaluer le devenir intra-intestinal et les propriétés immuno-modulatrices d'une bactérie alimentaire ne peut être remplacé par des méthodes *in vitro* ou *in silico* (Remplacement). Une première étape *in vitro* (digestion) a déjà été réalisée et nous souhaitons une confirmation *in vivo*, ainsi qu'étendre les observations à l'immunité de l'hôte. De plus, le nombre minimum de porcelets nécessaires à l'étude a été calculé en fonction de la variabilité des paramètres immunitaires que nous souhaitons étudier (Réduction). Enfin, l'ensemble de l'expérimentation sera réalisé par des personnels formés et entraînés à la manipulation des porcelets, et notamment au gavage orogastrique. Les animaux seront observés régulièrement pour détecter tout signe de souffrance. Le stress engendré par l'isolement en cages individuelles sera minimisé par les interactions visuelles et auditives des animaux placés dans les mêmes salles ainsi que par l'enrichissement du milieu (Raffinement).

7347 Nos recherches visent à mieux comprendre les mécanismes responsables du dérèglement de l'excitabilité neuronale observé dans les crises d'épilepsies. Les mutations du gène codant pour le canal sodique Nav1.1 sont impliquées dans plusieurs formes d'épilepsie, par exemple la GEFS+ ("Generalised Epilepsy with Febrile seizure plus") et le syndrome de Dravet, épilepsies très graves et pharmaco-résistantes. L'étude des phénomènes épileptiques et de leurs effets sur les capacités cognitives et le comportement nécessite de faire appel à des modèles animaux actuellement difficilement remplaçables. Dans un projet précédemment autorisé nous utilisons une lignée de souris dont le gène codant pour Nav1.1 a été invalidé pour étudier les conséquences de la répétition des crises généralisées induites par une hyperthermie sur l'aggravation du syndrome et sur les capacités cognitives des individus. L'hyperthermie est un facteur déclenchant de crises dans notre modèle tout comme chez les patients épileptiques (crises fébriles). Nous devons maintenant étudier si les effets observés dépendent des crises d'épilepsie induites ou de l'hyperthermie utilisée. L'objet de la présente demande est par conséquent d'induire des crises d'épilepsie comparables par un autre moyen, l'inhalation de flurothyl. Le flurothyl est utilisé car il permet de déclencher des crises généralisées dont la répétition aboutit à une épileptogenèse et l'apparition de crises spontanées chez des souris sauvages non mutantes, tout comme notre modèle de crises induites par hyperthermie sur les souris mutantes. Après induction les souris suivront soit des tests cognitifs soit une mesure par électrocorticogramme (enregistrement de l'activité cérébrale grâce à des électrodes en contact direct du cortex). Pendant les crises d'épilepsie généralisées les humains atteints du syndrome de Dravet ne sont pas conscients et ne perçoivent aucune douleur, c'est donc très probablement le cas dans nos modèles animaux. De plus, ces animaux ne montrent aucun signe de douleur entre les crises et les inductions par le flurothyl n'augmentent pas la mortalité des souris. Les souris GEFS+ non induites sont comparables aux souris sauvages en terme de courbe de croissance, de reproduction, de comportement, et d'activité électrique cérébrale (électrocorticogramme), la mutation seule est donc non dommageable.

Les souris ne peuvent pas être remplacées car elles sont nécessaires à la validation scientifique des résultats acquis. Le principe de réduction est appliqué en se fondant sur des calculs de puissance statistiques permettant de déterminer les cohortes minimales d'animaux nécessaires à une validation statistiquement fiable des résultats. Le principe de raffinement sera mis en œuvre par le recours à l'anesthésie et à l'analgésie quand cela est nécessaire en s'appuyant sur des grilles d'évaluation de la douleur qui prévoient la mise en œuvre de points limites adaptés et précoces. Nous utiliserons 132 souris dans ce projet.

Notre société veut proposer aux institutions publiques et privées la réalisation de modèles expérimentaux de tumeurs sous-cutanées chez la souris. Les modèles que nous proposons permettront d'évaluer l'effet bénéfique ou délétère de composés pharmacologiques dans un contexte pathologique d'échec thérapeutique. Nous développons de nouvelles approches expérimentales, basées sur l'étude du microenvironnement. Pour cela nous utilisons la microdialyse intra tumorale, sur des modèles murins PDX pour "patient derived xenograft". Ces approches sont basées sur l'utilisation de technique innovante permettant le dosage au sein de la tumeur de molécules cibles des traitements, ou du composé thérapeutique. Dans cette optique, nous proposons les modèles dans

une activité de service, recherche pré-clinique sur des composés thérapeutiques, avec un nombre de 5 études par an, comprenant 80 souris par étude (pour un total sur 5 ans à 2000 souris).

Nous proposons donc d'évaluer dans notre activité de service, les propriétés de nouvelles molécules sur différents modèles murins greffés avec des tumeurs de patients.

Ces expériences seront réalisées dans les meilleures conditions éthiques en respectant la règle des 3Rs (Réduire, raffiner, remplacer) et conformément à la législation en vigueur. A ces fins, les composés testés auront été préalablement testés in vitro par le client, afin de déterminer les doses à utiliser, de s'affranchir de la toxicité des composés et de limiter le nombre d'animaux. Les groupes sont de 8 animaux pour obtenir des tests statistiques robustes, évitant ainsi de réitérer une étude. Les animaux des études sont hébergés dans des conditions veillant au respect de leur bien-être (en fratrie) et avec un milieu enrichi (jouet) afin de limiter leur stress. Les animaux sont suivis quotidiennement afin de détecter tout inconfort ou souffrance. Une étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et notre équipe d'expérimentateurs permet d'intervenir immédiatement sur les animaux en cas de nécessité.

7348 Les êtres humains peuvent être victimes d'un grand nombre de maladies génétiques (dues à des mutations du génome touchant la lignée germinale, et donc leur descendance). Dans ce cas, les enfants peuvent naître avec des déficits en protéines indispensables à la vie. Parmi les options thérapeutiques existantes, l'administration de la protéine manquante sous forme thérapeutique est une des alternatives possibles. La production de ces protéines, pour avoir une efficacité thérapeutique, doit obligatoirement se faire dans un système qui permet à la protéine d'avoir la conformation et l'activité fonctionnelle (exemple enzymatique) requise. Parmi les différentes possibilités qui existent pour atteindre ce but, la production puis la purification des protéines thérapeutiques à partir de lait de mammifères est une des plus efficaces.

Cette demande d'autorisation de projet concerne donc l'optimisation de la création de lignées de lapins transgéniques capables de produire plusieurs protéines recombinantes humaines dans le lait des femelles, sur une période de 5 ans.

Nous souhaitons améliorer la qualité et l'efficacité des protéines recombinantes produites dans le lait de lapines transgéniques, créées par transgénèse par micro-injection d'un fragment d'ADN d'intérêt dans le noyau ou le cytoplasme d'embryons au stade une cellule, en utilisant la technologie CRISPR-Cas9.

Ces protéines recombinantes auront pour objectif de soigner, en fonction des objectifs scientifiques déterminés par la direction scientifique de l'entreprise, des maladies génétiques orphelines létales (maladies de Pompe, Gaucher, Fabry, liste non exhaustive) ou plus fréquentes, telles que les hémophilies. Les protéines recombinantes produites pourront aussi soigner des maladies environnementales comme des intoxications aux pesticides, des addictions à certaines drogues et les effets de gaz neurotoxiques utilisés lors d'attaques terroristes.

Il n'existe pas de méthode de remplacement et le lapin est l'espèce de choix pour atteindre les objectifs du projet, notamment en quantité et rapidité (jusqu'à 10 litres de lait produit par an et une gestation de 30 jours).

Dans le cadre de la Réduction, notre stratégie de création de lapins transgéniques est basée sur un maximum de journées entières de manipulation (récupération des embryons, micro-injection et réimplantations) en un minimum de semaines pour réutiliser les lapines non gestantes le plus rapidement possible. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés par jour de manipulation, les lapines reçoivent un traitement de super-ovulation qui augmente le nombre de follicules ovulés, elles sont accouplées avec des mâles reproducteurs puis euthanasiées. Les embryons récupérés sont micro-injectés puis réimplantés dans des femelles de même stade hormonal, dites « receveuses ». Après la gestation, ces femelles receveuses seront réutilisées en tant que femelles « donneuses » afin de micro-injecter dans leurs embryons l'ADN de cette même protéine ou de la protéine d'intérêt suivante. L'optimisation de l'utilisation des lapines nous permet de réduire jusqu'à 50% le nombre d'animaux utilisés pour l'ensemble du projet. C'est pourquoi nous prévoyons d'utiliser entre 540 et 1080 lapines (donneuses et receveuses d'embryons, conservation des lignées transgéniques) pour ce projet.

La Réduction par optimisation est complétée par les méthodes de Raffinement suivantes. Toutes les interventions seront faites sous anesthésie et les animaux recevront des anti-inflammatoires locaux et généraux après chaque intervention.

Nous réaliserons ensuite l'élevage des animaux transgéniques et différentes expérimentations seront menées en fonction du modèle créé (caractérisation génotypique, prélèvement de lait, sang, sperme). Nous élèverons également des animaux de phénotype sauvage pour la production d'embryons liée à l'activité de transgénèse et pour l'accouplement avec les animaux transgéniques afin de générer des descendants (F1, F2). Ceci permettra de fonder les élevages des animaux qui produiront les protéines thérapeutiques.

7349 La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorures lié à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies aériennes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour tous les patients et d'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. Une solution proposée est d'activer d'autres canaux chlorures qui compenseraient le défaut de CFTR et le seul autre canal bien caractérisé est TMEM16A ou ANO1. Une activation de ce canal permettrait une restauration des efflux chlorures de façon indépendante à la protéine CFTR.

Il a été montré qu'il était possible d'activer ANO1 par une molécule thérapeutique en agissant sur des petits ARN sur des cellules des voies aériennes. Ces résultats nous ont conduits à effectuer une étude pilote chez la souris dans laquelle nous avons pu mettre en évidence que la technique d'administration intranasale était bien tolérée et qu'elle se révélait active chez la souris au niveau de la trachée sans entraîner de conséquences négatives observables (comportement, poids...).

Des travaux récents du laboratoire ont montré in vitro que notre molécule était également active sur des cellules d'autres organes (os, pancréas...) ce qui nous amène à penser qu'une administration systémique pourrait être envisagée pour corriger l'ensemble des problèmes liés à la mucoviscidose. Les souris atteintes de mucoviscidose meurent au moment du sevrage d'une obstruction digestive qu'il est possible de compenser en leur donnant un laxatif. Le projet a pour but de traiter les animaux par injection intrapéritonéale de notre molécule au moment du sevrage.

Type d'animaux : 129.Cftrtm1Eur

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un nombre maximal de 32 souris pour une durée maximale de 1 an. Ce 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 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.

Pour la détermination du nombre de souris requis minimal un test de puissance a été effectué en se basant sur des travaux précédents et sur le minimum d'effet que l'on veut obtenir (50%) avec un risque α de 90 avec une valeur α de 5% (<http://powerandsamplesize.com/Calculators/Compare-2-Means/2-Sample-Equality>).

Remplacement-Réduction-Raffinement :

Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des techniques déjà établies et publiées qui permettent de limiter le nombre de souris aux expériences indispensables permettant d'avoir assez de données pour une analyse statistique. Afin de limiter au maximum le recours aux animaux, nous avons effectué de nombreuses expériences in vitro et ex vivo (cultures de cellules issues de patients) qui ont montré des résultats positifs et qui sont en cours de publication. De plus, grâce à notre projet précédent sur la souris qui a reçu les autorisations nécessaires, nous savons que notre molécule n'a pas de conséquence sur la perte de poids ou sur son comportement lors d'une administration intranasale. Par ailleurs, des travaux de la littérature utilisant des molécules similaires ont montré que l'administration systémique était possible chez la souris sans induire d'effets secondaires. Nous nous baserons sur ces articles pour déterminer la dose. Une prise de poids et une évaluation comportementale seront effectuées quotidiennement pour vérifier le bon état de la souris.

Les animaux sont hébergés dans les conditions standards A1 EOPS (autoclave et sas chimique en barrière) :

- Hébergement en portoirs ventilés en pression positive
- Salle d'hébergement en surpression
- Cycle nyctémère de 12h (8h-20h jour / 20h-8h nuit)
- Hygrométrie est de 55% (+/- 10%)
- Température comprise entre 20°C et 24°C
- Change litière/abreuvement/nourriture 1 fois par semaine + vérification quotidienne
- Enrichissement du milieu : coton de nidification pour les cages accouplements / maison rouge pour les cages de stock (Techniplast).

7350 La réglementation en vigueur concernant la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques (Décret n° 2013-118 du 1er février 2013 relatif à la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques et Arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques) requiert que le personnel soit compétent. Le personnel de notre institut suit les formations théoriques obligatoires. Afin de compléter cette formation, nous offrons à nos nouveaux arrivants ainsi qu'aux personnes souhaitant maintenir leurs compétences techniques, la possibilité de réaliser les techniques d'administration ou de prélèvements sanguins réalisés couramment dans nos animaleries.

Cette formation continue permet ainsi aux expérimentateurs de rester compétents et de réaliser l'ensemble des projets de l'institut dans les meilleures conditions pour les animaux. Nous participons également à la formation pratique des étudiants et chercheurs dans le cadre de la formation réglementaire de niveau 1 (concepteur de projets).

L'ensemble de nos projets se déroulant sur animaux vivants, il ne nous est pas possible de réaliser des formations autrement chez la souris.

Par ailleurs, afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, dès que possible, les animaux servant aux formations proviendront d'autres projets terminés et de sévérité légère à modérée. Un maximum de 160 animaux sera nécessaire par an (40 animaux par session de formation, 4 sessions par an) pour assurer la formation continue, le maintien de compétences de l'ensemble du personnel auxquels se rajoutent 56 animaux pour la formation pratique réglementaire (28 animaux par session, 2 sessions maximum par an), soit 1080 animaux maximum sur toute la durée du projet (5ans). Un animal ne pourra subir que 2 procédures au maximum.

Aucun dommage particulier n'est attendu au cours de ces formations, les procédures étant classées légères. Toute procédure potentiellement stressante sera réalisée sous anesthésie générale afin de préserver le bien-être animal.

Cette demande d'autorisation consiste en une modification d'une demande précédente, de laquelle nous souhaitons modifier certaines procédures afin d'affiner les modèles d'épileptogénèse utilisés. Les synapses du système nerveux central, organisées en réseau, assurent la transmission normale des informations dans le cerveau. Différents facteurs (un traumatisme, une infection, une tumeur, une forte fièvre,) peuvent endommager ces réseaux et les rendre épileptiques. Notre projet vise à: 1) comprendre les mécanismes à la base de cette transformation du cerveau; 2) proposer une nouvelle cible potentielle pour contrecarrer les phénomènes qui mènent à l'épilepsie. Cette cible est le récepteur mGlu7, une protéine qui lie le glutamate, le principal neurotransmetteur du système nerveux central. mGlu7 est connu pour participer dans l'épilepsie, l'addiction et la schizophrénie depuis longtemps. Cependant, aucune drogue spécifique n'existait jusqu'à récemment pour cibler le récepteur. Lors de cette étude nous allons pouvoir utiliser des nouveaux composés pharmacologiques très sélectifs développés par des collaborateurs chimistes. Ces composés seront testés dans deux modèles d'épilepsies chez la souris. Nous allons réaliser des expériences de comportement couplées à des mesures de l'activité cérébrale (vidéoélectroencéphalogramme ou vidéo-EEG) chez la souris normale, la souris dont le récepteur mGlu7 est partiellement inactivé, ainsi que chez des modèles de

souris permettant de comprendre dans quel type de cellule les modifications liées à l'épilepsie ont lieu. Les objectifs spécifiques de notre étude sont de savoir 1) si l'activation de mGlu7 peut freiner ou améliorer l'apparition de crises épileptiques spontanées; 2) si la mutation de mGlu7 prédispose le cerveau aux crises épileptiques; 3) quels gènes sont exprimés lors du processus d'épileptogénèse dans des sous-types neuronaux d'intérêt.

La règle des 3R sera suivie de la façon suivante:

Remplacer: Des méthodes *in vitro* basées sur la culture cellulaire ont été utilisées pour la caractérisation initiale des composés (agonistes/antagonistes de mGlu7). Les effets physiopathologiques que nous souhaitons étudier sont trop complexes pour être récapitulés *in vitro*. Néanmoins nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations *ex vivo* (ex. coupes de cerveau) avec l'euthanasie et le minimum de détresse pour l'animal. **Réduire:** nous essayerons de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal: i) performance cognitive; ii) modifications morphologiques du cerveau liées aux crises

Épileptiques; iii) localisation du récepteur et des marqueurs neuronaux suite à l'extraction du cerveau et l'analyse immunohistochimique.

Raffiner: Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales.

Huit animaux de chaque génotype seront utilisés pour chaque condition. Nous estimons à 605 souris le nombre total de souris utilisé sur 4 ans.

Les animaux seront hébergés en groupe sauf lors de l'implantation des dispositifs nécessaires pour enregistrer l'activité cérébrale, afin d'éviter le risque de blessure mutuelle (par ex. connecteurs arrachés). L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement par les expérimentateurs et tout signe de détresse ou problème de santé sera adressés au plus vite. Cette étude nous permettra de proposer mGlu7 comme candidat potentiel pour le ciblage d'une pathologie très invalidante telle l'épilepsie.

7351 Dans le cadre d'un projet de développement de molécules thérapeutiques, nous avons effectué une première expérimentation animale afin d'évaluer l'effet anti-tumorale de 3 molécules, l'Ethinylestradiol, l'Eburnamone et la Doxorubicine, sur un modèle de lymphomes primitifs des séreuses (PEL) chez des souris immunodéficientes, généré par l'inoculation intrapéritonéale de cellules BC3, une lignée de cellules humaines PEL. Ce premier projet a permis de valider les études préalables effectuées *in vitro*, ainsi que de nous permettre de sélectionner une molécule cible, l'Eburnamone. Nous souhaiterions à présent, tester de nouveau l'effet anti-tumorale de cette molécule sur le modèle de souris PEL. Les objectifs de ce 2eme projet seraient de valider les résultats *in vivo* précédemment obtenus, d'optimiser l'effet anti-tumoral du traitement en apportant certaines modifications au projet et en testant l'effet-doses chez les souris, mais également d'en évaluer la toxicité. Le cas échéant, nous pourrions démarrer un essai clinique avec cette molécule à des fins de développement thérapeutique dans la maladie de Kaposi et/ou du PEL. Pour se faire, l'essai se déroulerait sur une période de 2 mois et comprendrait 36 souris femelles NOD/SCID âgées de 6 semaines réparties en 6 groupes (6 souris par groupe) en fonction du traitement. Conformément aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux se restreint au minimum nécessaire afin d'avoir des résultats significatifs. Par ailleurs, L'état de santé des animaux sera surveillé quotidiennement (le lundi, le mercredi et le vendredi chaque semaine) par du personnel compétent. Les points suivants seront considérés comme points limites :

1. Tout dérèglement physiologique aboutissant à une incapacité prolongée ou irréversible à se nourrir ou à boire (une bouillie sera donnée en cas de fatigue des animaux pour s'assurer qu'ils continuent de s'alimenter et qu'ils ne se déshydratent pas).

2. Modification du comportement caractéristique d'une douleur intense, une détresse ou une souffrance (absence de locomotion, pelage hérissé et/ou terne, prostration, dos voûté)

3. Anomalies pouvant entraîner une douleur intense, une détresse ou une souffrance : perte de poids supérieure ou égale à 20% du poids initial de l'animal, prise de poids supérieure ou égale à 150% du poids initial, plaies et ulcères, tumeurs, fractures...

Les animaux sont stabulés en portoirs ventilés avec un système d'abreuvement automatique et un accès ad libitum à la nourriture. Les conditions de température et d'hygrométrie sont contrôlées et monitorées. Le cycle d'éclairage est de 12h par jour (6h-18h). Le milieu est enrichi avec au choix : lanières de papier Kraft, maisons en carton, tunnel en carton ou carré de coton compacté.

Les animaux témoins n'ayant reçu ni inoculation ni administration de molécules seront réutilisés dans la prochaine étude.

La décision de garder les animaux en vie sera prise par le responsable du projet.

La stéatose hépatique non alcoolique est en constante augmentation et peut évoluer vers la stéatohépatite puis la cirrhose. Le projet vise à comprendre le rôle des protéines KLF10 et KLF11 qui régulent le métabolisme glucidique et lipidique, lequel est fortement perturbé lors de ces maladies du foie. Pour cela nous envisageons de réaliser des cultures primaires de cellules hépatiques provenant de souris sauvages et de souris déficientes soit pour KLF10 ou KLF11, et d'étudier la réponse de ces cellules à différents agents (glucose, acides gras, hormones...) et différentes conditions mimant les conditions pathologiques (stress cellulaire, mort cellulaire). Compte-tenu des différences importantes entre mâles et femelles en ce qui concerne d'une part le métabolisme hépatique et les pathologies associées et d'autre part le phénotype des souris déficientes pour KLF10, nous réaliserons les expériences avec des cellules provenant de souris mâles et femelles respectivement. Ces expériences nécessitent des cellules très différenciées et ne peuvent pas être réalisées avec des lignées cellulaires tumorales. Les lignées cellulaires ne permettent pas non plus d'étudier les différences mâles/femelles. Pour toutes les expériences prévues, les animaux subiront une anesthésie sans réveil et seront uniquement utilisés comme donneurs de cellules primaires. Les cellules hépatiques étant abondantes, cette approche a l'avantage de permettre la réalisation de nombreuses conditions expérimentales à partir d'un nombre réduit d'animaux. Ce projet i) permettra de comprendre des mécanismes impliqués dans le développement des maladies du foie et ii) ouvrira la voie à l'établissement d'un modèle de remplacement en ce qui concerne les études de dimorphisme sexuel hépatique. Pour la totalité de projet le nombre d'animaux prévus est de 100.

7352 La maîtrise de l'homéostasie calcique est indispensable pour assurer la production d'œufs de qualité et l'intégrité osseuse des poules pondeuses sur toute la durée de leur vie productive qui peut atteindre 100 semaines. Ce projet vise à comprendre les régulations de la captation digestive du calcium, de sa mise en réserve et de sa mobilisation osseuse chez la poule pondeuse à différents stades physiologiques. Les comparaisons porteront sur des poulettes immatures, des poules mûres à un stade de production précoce (pic de ponte autour de 26 semaines d'âge) ou tardif (autour de 90 semaines d'âge).

Les poulettes issues de souche commerciale de type « ponte » seront élevées au sol, en groupe, conformément aux conditions standard d'élevage jusqu'à l'âge de 17 semaines. Les poules pondeuses mûres, précoces ou tardives, issues d'un élevage en conditions de production d'œufs de type « cages aménagées » seront placées en cages individuelles pour observation de leur activité de ponte pendant au maximum trois semaines. Cette procédure est indispensable pour enregistrer l'heure de ponte et identifier des poules à 5 stades précis du cycle ovulatoire. Elles recevront des aliments standards utilisés en élevage et respectant les besoins nutritionnels, avec un apport de carbonate de calcium adapté (4%), qui se fera sous forme broyée ou particulaire au stade précoce ou sous forme particulaire au stade tardif (56 poules/groupe).

Les poulettes et poules (6 par condition expérimentale) seront soumises à une prise de sang avant euthanasie, pour les secondes à des stades précis du cycle ovulatoire (6 par condition expérimentale). L'expérimentation sera renouvelée si nécessaire jusqu'à trois fois sur une durée totale de cinq ans. Le nombre d'animaux maximum sera donc de 504 poules mûres et 90 poules immatures respectivement pour les 5 ans d'expérimentation. L'euthanasie permettra le recueil de tissus biologiques afin d'étudier l'expression des acteurs moléculaires impliqués dans les régulations de l'absorption du calcium et du remodelage osseux.

Remplacement : la régulation du métabolisme calcique dépend d'effecteurs et de régulations hormonales intervenant à différents niveaux de l'organisme (os, reins, intestin et la glande parathyroïde) ce qui exclut le recours à un modèle *in vitro* qui ne pourrait pas rendre compte des interactions entre les différents organes.

Réduction : Le nombre d'animaux (6/lot) a été choisi pour mettre en évidence une différence significative entre groupes pour la teneur en calbindine avec une puissance de 90%, d'où le nombre de 6 animaux/condition expérimentale. Pour arriver à ce nombre à chaque stade du cycle ovulatoire (30 poules), nous disposerons de 56 poules matures en cage individuelle à chaque stade et pour chaque régime alimentaire (3x56). Les animaux qui ne seront pas prélevés, car ne correspondant pas au bon stade physiologique seront remis en élevage de production d'œufs. L'identification du stade dans le cycle ovarien est cruciale car elle est associée à la forte variation de la phosphatémie et des régulations hormonales.

Raffinement : les poules mûres placées en cages individuelles pendant 3 semaines maximum, seront réparties entre 28 cages contiguës enrichies par un jouet à picorer, permettant des contacts sociaux. Les animaux seront visités au minimum une fois par jour et toute manifestation de détresse ou de maladie prise en considération pour envisager le retrait des animaux ou leur euthanasie si besoin. Les personnes en charge des procédures expérimentales veilleront au respect des animaux en toutes circonstances.

7353 Les tumeurs cérébrales constituent la première cause de mortalité et de morbidité par cancer chez l'enfant et l'adulte jeune. Les gliomes malins infiltrant du tronc cérébral (ou DIPG), qui représentent 10 à 15% des tumeurs cérébrales pédiatriques, sont les formes les plus graves et les plus mal connues sur le plan biologique. Ces tumeurs sont universellement incurables et constituent le plus grand défi thérapeutique de l'oncologie pédiatrique à ce jour. Des mutations originales de l'histone H3, quasi-constantes dans les DIPG et jamais décrites dans aucun autre type de cancer, ont été découvertes. Il s'agit donc d'un mécanisme oncogénique complètement inédit et intimement lié au développement de cette partie du cerveau. Par ailleurs, les DIPG ne forment jamais de masse tumorale, mais infiltrent les structures cérébrales normales puis se disséminent dans la totalité du cerveau. Ces propriétés d'invasion, caractéristiques des DIPG, et une cause fréquente de rechute après une radiothérapie initiale limitée au tronc cérébral, reposent sur d'importantes interactions entre la tumeur et son microenvironnement qui peuvent être étudiés exclusivement dans des modèles *vivo*.

Une singularité des gliomes du tronc cérébral résulte dans leur phénotype systématique d'infiltration des structures normales, l'absence de masse tumorale et l'importante capacité d'invasion du tronc cérébral dans un premier temps, puis plus largement du cerveau au décours de la maladie. Ces particularités résultent des interactions des cellules tumorales avec leur stroma qui ne peuvent être appréhendées que dans des animaux vivants, où la variété et complexité du microenvironnement tumoral existe entièrement. Les tests que nous voulons effectuer seront mis en œuvre *ex vivo*. Toutefois, la croissance dans le contexte normal, l'invasion des cellules tumorales, avec le stroma, dans le microenvironnement et avec les échanges avec le corps entier (immunité, médiateurs) nécessitent obligatoirement un passage *in vivo* dans le corps entier vivant de l'animal modèle de cancer. Par la suite, les processus et molécules impliquées seront étudiées *ex vivo*. De ce fait, chaque utilisation d'animal sera valorisée au maximum.

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

Afin d'étudier un panel de modèles reflétant la variabilité inter-tumorale pour les différents sous-types tumoraux et d'obtenir des statistiques solides dans ces expériences, nous utiliserons la totalité de nos

lignées cellulaires tumorigènes et dont les études préliminaires in vitro ont prouvés l'aptitude des cellules à envahir une matrice extracellulaire synthétique (type matrigel). Les processus d'étude de l'interaction entre le microenvironnement et les cellules tumorales ne peuvent être étudiés que sur un modèle vivant.

La contrainte pour l'animal sera Durant toute la période d'acclimatation, l'animal sera observé quotidiennement et stabulé avec des congénères avec un enrichissement de la cage. La procédure chirurgicale classée sans réveil sera réalisée sous anesthésie profonde. Au total, nous utiliserons 192 souris pour ce projet.

7354 L'infection des plaies reste un défi et représente un fardeau considérable en termes de soins. Une reconnaissance précoce associée à une intervention diligente, appropriée et efficace n'a jamais été plus importante pour réduire les conséquences sur l'économie et la santé, tout particulièrement dans le contexte d'une résistance de plus en plus importante aux antibiotiques. Lorsque la prise en charge d'infections sur plaies cutanées est tardive, le traitement passe par l'administration par voie orale d'antibiotiques, le plus souvent à spectre large. Ce traitement entraîne une exposition de l'ensemble de l'organisme à la molécule active, pouvant induire, notamment avec les antibiotiques l'émergence de résistance.

Les pansements antimicrobiens, y compris les pansements à l'argent, sont utilisés dans la prévention ou la prise en charge des infections de nombreux types de plaies. Naguère, l'usage des pansements à l'argent était considérablement répandu. Toutefois, certaines études récentes ont conclu que les données disponibles sont insuffisantes pour démontrer que les pansements de ce type améliorent les taux de cicatrisation. Cette conclusion a suffi à créer des doutes sur son mécanisme d'action et son efficacité.

Le développement de nouveaux pansements par la fonctionnalisation chimique peut permettre de prévenir le développement de germes sur la plaie traitée, de traiter de manière locale une plaie infectée, de manière continue dans le temps grâce à un système chimique de libération contrôlée de principes actifs. Notre équipe a développé un nouveau pansement (dit « pansement fonctionnalisé ») avec des textiles non tissés finis chitosane chargés par l'argent et de l'iodure pour l'application antibactérien sur la plaie. L'étude in vitro sur ce pansement fonctionnalisé a montré la délivrance prolongée de molécules actives ayant une activité antibactérienne.

Les résultats obtenus par les tests in vitro ne peuvent pas se remplacer à des données in vivo sur l'efficacité antimicrobienne, l'objet de cette expérimentation est de tester l'activité de différents pansements fonctionnalisés avec différentes molécules actives, chez la souris sur des plaies infectées par des germes bactériens couramment rencontrés dans ce type d'infection.

Cette étude consiste à créer une plaie cutanée d'épaisseur partielle en zone sous scapulaire chez la souris, de l'inoculer à l'aide d'un inoculum bactérien de concentration connue, et d'appliquer un pansement des supports fonctionnalisés. Suite à cela, les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique et un régime normal ad libitum pour limiter toute douleur potentielle. Ces pansements seront renouvelés au bout de trois jours, et les animaux seront euthanasiés au 7ème jour, permettant une observation macroscopique de la plaie, ainsi qu'une étude microbiologique des pansements à mi-parcours et une semaine.

En référence aux publications antérieures. Nombre d'animaux par groupe : n = 9 suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ($\alpha=80\%$, $p=0.05$) une différence entre les groupes par l'efficacité du patch. Après une étude in vitro préalable, permettant d'étudier l'adhésion bactérienne aux différents supports, la méthode de traitement chimique de matières a été optimisé, donc de réduire le nombre de groupe de test au minimum (1 groupe de pansement fonctionnalisé avec l'agent antibactérien, 1 groupe de pansement fonctionnalisé et 1 group témoin avec pansement non-modifié) pour l'étude in vivo sur trois souches de bactéries (Staphylococcus aureus, E. coli et Pseudomonas aeruginosa), par la suite de réduire le nombre d'animaux utilisés à 81 totalement dans le projet in vivo.

Les études pilotes ont été réalisées pour confirmer la possible atteinte des objectifs des procédures expérimentales. Néanmoins, au cours de l'étude les animaux auront un suivi journalier afin de pouvoir

observer tout changement de comportement ou toute apparition de signes de douleur. Chaque observation sera consignée dans un cahier de suivi des animaux.

7355 Malgré les récentes avancées dans le traitement des mélanomes avec l'avènement des thérapies ciblées (Vémurafénib et Cobimétinib notamment) et l'augmentation de la survie des patients porteurs d'un mélanome à un stade avancé (métastatique) à 11 mois en moyenne contre 6 mois auparavant, tous rechutent finalement du fait du développement d'une résistance à leur traitement.

Notre équipe a récemment mis en évidence l'hyperactivation d'un complexe protéique impliqué dans l'initiation de la traduction dans les tumeurs résistantes et identifié des drogues (silvestrol et dérivés synthétiques) ciblant ce complexe et qui permettraient de resensibiliser les cellules tumorales au Vémurafénib + Cobimétinib.

Le traitement de lignées cellulaires de mélanomes humains in vitro par la combinaison des thérapies ciblées Vémurafénib + Cobimétinib pendant 3 jours permet d'éradiquer en grande partie les cellules tumorales mais quelques cellules persistent cependant. Ces dernières s'avèrent particulièrement sensibles au silvestrol et à ses dérivés. La séquence thérapeutique consistant à traiter par la combinaison Vémurafénib + Cobimétinib (traitement de référence) puis par silvestrol (ou dérivé) paraît donc prometteuse.

Le but de ce projet est de confirmer ces résultats in-vivo sur trois modèles de xénogreffes de mélanomes humains sur souris nude.

L'expérimentation in vitro a permis de montrer l'intérêt de notre démarche mais ne suffit pas à elle seule à justifier l'exploration de cette thérapeutique séquentielle dans des essais cliniques. L'expérimentation dans des modèles de cancer chez la souris ne peut donc pas être remplacée par des tests in vitro. En effet, il est nécessaire de vérifier cet effet dans un organisme entier incluant les interactions avec les systèmes nerveux et hormonaux.

Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum tout en assurant la valeur des résultats de l'expérimentation. Nous disposons de 3 modèles validés de mélanomes humains greffés sur souris nude et pour ces 3 modèles, le nombre sera réduit au minimum nécessaire pour comparer les différents protocoles de traitement avec une puissance statistique suffisante. La réalisation de ce projet nécessitera au total 240 souris nude.

Dans un souci de raffinement, l'utilisation de croquettes contenant le Vémurafénib et le Cobimétinib permettra d'éviter le gavage quotidien des souris. Les animaux seront régulièrement évalués par le personnel pour prévenir de toute souffrance.

7356 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Altéplase) est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aiguë de l'AVC ischémique thromboembolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, efficacité limitée chez 50% des patients, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique.

Notre laboratoire a développé un modèle d'AVC utilisant des thrombi (caillot de sang) chez le Rat représentatif des AVC chez l'Homme ; en effet ce modèle a été utilisé en phase préclinique de développement de nouveaux thrombolytiques. Ce modèle présente néanmoins une variabilité importante en ce qui concerne les résultats obtenus lors des évaluations comportementales ou des observations de lésions cérébrales post-mortem. En effet l'intensité des déficits observés s'échelonne entre les troubles de la posture et de la locomotion jusqu'à l'hémiplégie et les lésions sont de tailles variables. Cette variabilité entraîne l'utilisation d'un nombre important d'animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

L'objectif de ce projet est de mieux définir les paramètres d'induction dans le but de contrôler le niveau de degrés de déficits ; pour cela nous souhaitons redéfinir la quantité et la taille des thrombi injectés

afin 1) d'augmenter le nombre d'animaux présentant des troubles au cours d'une expérience et ainsi réduire le nombre total d'animaux utilisés, 2) de mieux contrôler l'intensité de déficits induits en provoquant majoritairement le niveau d'atteinte choisi au départ, 3) d'induire moins de mortalité dans les 48h premières heures suivant la thromboembolie, 4) de vérifier la sensibilité de ces différents niveaux de déficits au rt-PA.

A terme, ce modèle permettra l'évaluation in vivo des propriétés thrombolytiques de nouvelles molécules ; les études in silico ou in vitro ne permettant en effet pas de prédire l'efficacité d'un traitement dans le cadre d'une intervention visant par exemple à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC thromboembolique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisés par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le Rat (remplacement).

Au total, un maximum de 300 rats mâles Wistar sera utilisé pour ce projet. Ils seront placés à 2 par cage, dans des cages ayant une superficie de 1800 cm², dès leur arrivée avec une feuille de papier absorbant comme dispositif d'enrichissement. Sur la base de notre expérience du modèle précédent, le nombre de rat utilisé pour chaque étude sera réduit au minimum (réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats (raffinement).

Chaque rat sera soumis au maximum à 5 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), puis à l'induction sous anesthésie gazeuse de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau (P2) et la mise en place d'un accès au niveau des veines de la queue pour l'administration des traitements (P3). Le traitement sera administré par voie intraveineuse 2h après l'induction de la thromboembolie sur animaux vigiles (P3) pendant 1h par perfusion.

Des tests neurologiques sensorimoteurs seront effectués 24 et 48 heures après induction de l'AVC en plaçant les animaux un par un dans un dispositif expérimental (espace ouvert de 60x40cm avec mûr de 20 cm) pendant 10 minutes environ, dans une pièce attenante à l'animalerie, afin d'évaluer les déficits neurologiques (P4).

Une surveillance soutenue des animaux sera réalisée au cours des 48 heures. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 3 minutes ou une incapacité à se déplacer avec abolition des réactions aux stimuli extérieurs et une perte complète des réflexes posturaux à 2h ou une incapacité à se déplacer avec perte complète des réflexes posturaux à 24h, sera euthanasié en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux seront placés à 2 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur euthanasie afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer les traitements et de les surveiller. Les animaux disposeront d'une feuille de papier absorbant dans leur cage comme enrichissement (raffinement).

7357 Ce projet, initié, évalué et validé par une direction scientifique, a pour objectif de développer un nouveau vaccin contre Bordetella pertussis. Afin de le développer, il est essentiel d'identifier les mécanismes de défense associés à cette bactérie.

Bordetella pertussis étant une bactérie GRAM négative, elle devrait être sensible aux mécanismes de bactéricide (SBA) et d'opsonophagocytose (OPA).

Le test de bactéricide consiste à mettre en contact :

- la bactérie cible
- les sérums dont on souhaite évaluer l'activité bactéricide
- une source exogène de complément.

Afin de réaliser ce test, il est donc nécessaire de se procurer du complément. A ce jour, les seules sources possibles pour se procurer du complément sont les animaux et le sang humain. Toutefois, toutes les sources de complément ne sont pas compatibles avec la bactérie B.pertussis car certains compléments sont capables de tuer la bactérie car ils contiennent des anticorps. Ainsi, dans cette étude la seule possibilité est l'utilisation d'animaux nouveau-nés dépourvus d'anticorps c'est à dire

n'ayant pas reçu de colostrum. Ainsi, le complément utilisé pour la réussite de ce projet provient de veau nouveau-né.

Un veau est en théorie capable de fournir environ 1 litre de complément. Cela permet de travailler entre 6 mois et 1 an sur des tests de bactéricidie. Ainsi, si le test de bactéricidie devient une preuve de protection pour B.pertussis, 10 bovins au maximum seront utilisés sur 5 ans.

Afin de garantir un bien être de l'animal tout au long du prélèvement, le bovin sera anesthésié une fois le prélèvement d'au maximum 20% de son volume sanguin circulant par l'utilisation d'une association d'anesthésique : xylazine et kétamine. Une fois le prélèvement effectué, l'animal sera euthanasié.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la dystrophie myotonique de Steinert (DM1) afin de pouvoir développer et tester de nouvelles approches thérapeutiques. La DM1 touche 1 personne sur 8000 en France. C'est une maladie dominante caractérisée par une grande variabilité dans la nature et la sévérité des symptômes. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire, une myotonie, une cataracte précoce, des troubles cardiorespiratoires, une hypersomnolence, un hyperinsulinisme et des anomalies cognitives et du comportement. La forme la plus grave de la maladie se manifeste dès la naissance par une hypotonie, des problèmes respiratoires sévères et des défauts de succion et de déglutition et par un retard psychomoteur et un retard mental. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace de cette maladie.

Afin d'étudier cette maladie au cours du développement et dans différents tissus, nous avons développé un modèle de souris transgéniques porteuses du gène muté responsable de la DM1. Ces souris transgéniques reproduisent certaines caractéristiques de la maladie. Seule l'utilisation de modèles animaux comme la souris nous permet d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie dans différents tissus et au cours du développement.

Nous utiliserons notre modèle afin d'étudier les mécanismes particuliers liés à la mutation, leurs conséquences physiopathologiques dans le but de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et physiologiques impliqués notamment 1) dans la forme sévère congénitale, 2) dans les anomalies du système nerveux.

La majorité de nos études consiste à utiliser des prélèvements après euthanasie de l'animal selon les procédures standard, réalisées dans le respect de l'éthique animal. D'après nos études antérieures sur le muscle, nous avons pu établir, en prenant en compte la variabilité phénotypique observée dans notre modèle, le nombre minimum de souris à utiliser par lot.

Au total nous utiliserons 1172 souris pour l'établissement de cultures de cellules à partir des animaux, pour des études physiologiques non invasives, pour des études in vitro post mortem et pour des études précliniques.

Ces animaux seront hébergés tout au long de l'étude dans des cages enrichies à l'aide de coton et d'abris en carton dans un environnement exempt d'organisme pathogène. Afin de réduire la souffrance et le stress des animaux, des points limites ont été établis et un suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement.

Motif de l'amendement: La dystrophie myotonique est une maladie qui touche le muscle mais également le système nerveux central, cet amendement porte sur l'ajout de 40 souris nouveau-nés supplémentaires qui seront injectés dans la veine temporale avec des vecteurs viraux (ou une solution contrôle) afin de réaliser des études précliniques. Pour éviter toute souffrance, les animaux seront anesthésiés. Ils subiront ensuite des tests comportementaux non douloureux.

7358 L'adénosine, un produit de dégradation de l'ATP, contrôle positivement ou négativement le relargage synaptique de neurotransmetteurs via l'activation respective des récepteurs de type A1 et A2. Si le rôle de ces récepteurs est relativement bien connu chez l'adulte, leur fonction dans le cerveau en développement reste peu explorée. Nos collaborateurs ont récemment montré qu'une exposition in utero et pendant la période de lactation à la caféine, un antagoniste naturel des récepteurs A2A et A1 entraînait une susceptibilité accrue à l'épilepsie ainsi que des troubles cognitifs et anxieux chez la descendance. Nos données récentes obtenues in vitro indiquent un rôle de la signalisation adénosine médiée par le récepteur A2A dans la stabilisation des synapses hippocampiques au cours de la période critique de formation des synapses. Cela nous a amené à proposer que les récepteurs A2A

postsynaptiques agissent pendant le développement comme des détecteurs d'activité synaptique et des stabilisateurs des synapses actives naissantes. Une libération d'adénosine d'origine présynaptique activerait les récepteurs A2A postsynaptiques et la voie de signalisation AMPc/PKA sous-jacente stabiliserait les synapses nouvellement formées. Un défaut d'activation des récepteurs A2A entraînerait la dislocation de la synapse après une période critique. Autrement dit, une fonction des récepteurs A2A postsynaptiques serait de signaler à l'élément postsynaptique que l'élément présynaptique est actif, et qu'il convient de maintenir la synapse. Ces résultats ayant été obtenus in vitro, le but de ce projet est de valider cette hypothèse in vivo dans un réseau neuronal intègre et d'analyser l'impact de cette signalisation sur la neurogenèse adulte, ce qui ne peut être étudié qu'in vivo. Le nombre d'animaux par condition et par expérience a été estimé au plus juste afin de limiter le nombre total d'animaux mis en œuvre tout en permettant d'assurer une puissance statistique acceptable pour nos expériences. Dans certaines expériences nécessitant une chirurgie, dont la douleur post-opératoire est de courte durée, un analgésique sera toutefois administré en sous-cutané en post-opératoire afin de minimiser l'inconfort de l'animal.

Ce projet nous permettra d'identifier un nouveau mécanisme impliqué dans les étapes précoces du développement du système nerveux central. Nos résultats nous permettront également de mettre en évidence que les effets délétères de l'ingestion de caféine chez la mère pendant la grossesse et l'allaitement sur le développement du cerveau de sa progéniture seraient en grande partie dus à une déstabilisation et à une perte anormale de certaines synapses.

Nombre total de souris utilisées dans ce projet : 433

Le gène nucleoredoxin-like 2 (Nxn12) a été identifié comme étant impliqué dans les mécanismes pathophysiologiques de la maladie d'Alzheimer. Cette maladie est caractérisée par des troubles cognitifs (notamment de la mémoire) et par la présence de lésions dans le cerveau des patients, incluant une tauopathie.

Le gène Nxn12 est bi-fonctionnel, codant pour un facteur trophique RdCVF2 et une thiorédoxine RdCVF2L.

L'objectif de ce projet est de vérifier si une thérapie génique destinée à rétablir le facteur trophique RdCVF2 ou la thiorédoxine RdCVF2L pourrait prévenir des déficits de mémoire ou de limiter la formation de lésions dans le cerveau.

Pour cela, des vecteurs AAV (control ou contenant les facteurs RdCVF2 ou RdCVF2L) qui pénètrent le cerveau et la rétine, seront injectés au niveau intracardiaque à 3 jours chez des souris et leurs effets seront analysés. Quatre groupes de 15 souris mâles chacun.

Ces animaux seront injectés début mars puis seront analysés dans des tests discriminants dans les travaux antérieurs (Openfield, Reconnaissance d'objets, Y maze, fear conditioning).

Les personnes impliquées dans ces expériences possèdent des autorisations d'expérimenter chez les rongeurs, et connaissent très bien les règles et appliquent les recommandations éthiques pour limiter la souffrance des animaux.

Réduction/Raffinement

Nous utiliserons 60 souris en tout (15 animaux par groupe), un effectif approprié pour les études comportementales, et suffisant pour montrer une différence statistique entre les groupes expérimentaux, si elle existe.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux. Aucun phénotype douloureux majeur n'est attendu. Pour minimiser le nombre d'animaux utilisés, les différents tests seront réalisés sur les mêmes animaux.

Remplacement

En l'état actuel des connaissances, les processus comportementaux tels que l'apprentissage, la mémorisation, ou les comportements relevant de la psychiatrie ne peuvent pas être étudiés par des études in silico ou in vitro. La souris reste de nos jours le modèle de choix largement utilisée pour l'évaluation des processus comportementaux en général et mnésique en particulier.

Les objectifs majeurs de ce projet sont de montrer que le gène *Nxn12* pourrait être une cible thérapeutique pour le traitement de troubles comportementaux tels que la maladie d'Alzheimer.

- 7359** La description et la compréhension des facteurs qui affectent la circulation d'agents infectieux dans les populations animales sauvages sont importantes d'un point de vue fondamental, mais aussi appliqué. Les populations de vertébrés sauvages vivant dans les zones polaires de l'hémisphère sud sont de plus en plus sujettes à des menaces dues à des maladies infectieuses, en plus d'autres menaces environnementales, et il est primordial de disposer de données de base sur l'état éco-épidémiologique de ces systèmes et de comprendre leurs dynamiques et l'efficacité éventuelle de moyens d'intervention sur des espèces menacées.

Dans la suite d'un projet débuté en 2013, nous proposons de continuer d'explorer la dynamique des interactions entre hôtes et agents infectieux dans les îles subantarctiques où se reproduisent de nombreuses espèces d'oiseaux marins et, à l'échelle de l'île d'Amsterdam, dans l'Océan Indien, la possible utilisation d'un vaccin pour protéger les individus d'espèces sauvages contre des épidémies de choléra aviaire. Cette maladie est en particulier responsable de fortes mortalités récurrentes de poussins d'une espèce menacée, l'albatros à bec jaune de l'Océan Indien (*Thalassarche carteri*). Les travaux consisteront en la réalisation de prélèvements d'échantillons (sang, écouvillon cloacal), d'injections d'un vaccin inactivé (0,5 ml, en sous-cutané) chez une partie des individus et du suivi d'individus à long terme pour étudier les dynamiques éco-épidémiologiques et des effets positifs attendus sur la survie des individus. Concernant l'expérience de vaccination, le travail impliquera sur trois ans 400 jeunes individus (poussins) et 160 adultes reproducteurs, dont une part de témoins non-vaccinés. Il s'agit d'optimiser un protocole de vaccination qui a donné de premiers résultats positifs lors d'une expérimentation précédente, mais qui demande à être affiné: test d'une nouvelle formulation du vaccin, avec ou sans rappel chez les adultes, et d'une vaccination de poussins à 7 et 15 jours. L'étude porte spécifiquement sur des populations naturelles d'oiseaux sauvages donc les animaux étudiés ne peuvent être remplacés par ceux d'autres espèces. Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction et de raffinement pour permettre des comparaisons pertinentes des taux d'exposition aux agents infectieux et des taux de survies entre groupes vaccinés et non-vaccinés. Les protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de minimiser la douleur et l'inconfort en faisant intervenir un personnel expérimenté pour les manipulations et en effectuant les prélèvements rapidement (moins de 5 min) et sans anesthésie. Plus précisément, les prises de sang sont réalisées à l'aile ou à la patte selon la taille de l'individu manipulé avec aiguilles et seringues. Les oiseaux sont relâchés rapidement sur le site de leur capture et les populations font l'objet de suivis démographiques.

- 7360** L'arrêt cardio-respiratoire (ACR) est une pathologie fréquente et sévère en termes de mortalité et de séquelles secondaires. Lorsque les manœuvres de réanimation débutées ne permettent pas un retour à une activité circulatoire, l'arrêt cardiaque est dit "réfractaire". Dans ces conditions, une technique de suppléance par circulation extra-corporelle peut être envisagée (ECMO). Dans ce contexte, la réanimation cardio-pulmonaire (RCP) est souvent prolongée jusqu'à la prise en charge spécifique intra-hospitalière, nécessitant de combiner des compressions thoraciques (CT) efficaces sur le plan circulatoire à une ventilation pour permettre les échanges gazeux. Ce massage cardiaque externe (MCE) peut être automatisé par des dispositifs dit de "planche à masser". La ventilation telle qu'elle est habituellement pratiquée lors de la RCP à l'aide d'un ballon manuel (BAVU) peut directement compromettre l'efficacité du massage cardiaque pour deux raisons principales. Premièrement, les CT sont souvent interrompus pour permettre de délivrer 1 ou 2 insufflations, interrompant d'autant la perfusion des organes (notamment du cerveau). Deuxièmement, l'augmentation de pression intra-thoracique liée aux insufflations vient s'opposer au fonctionnement de la pompe cardiaque (retour veineux). Le syndrome de Lazare, qui décrit une ventilation trop agressive lors de la RCP empêchant le retour à une activité cardiaque spontanée est bien décrit dans la littérature.

Afin de combiner des CT efficaces sur la circulation et une ventilation suffisante, deux alternatives à la RCP classique permettant de ne pas interrompre les CT sont possibles : la mise en place d'une insufflation trachéale continue sur sonde d'intubation par valve de Boussignac (B-CARD) et l'optimisation de l'interaction respirateur-MCE telle que propose le mode Cardio Pulmonary Ventilation (CPV) sur un ventilateur à turbine (Monnal T60). Ces deux techniques sont de nouvelles approches

et ne figurent pas à l'heure actuelle dans les recommandations internationales de prise en charge de l'arrêt cardiaque.

Le but de l'étude est d'étudier l'impact circulatoire et ventilatoire de trois stratégies de ventilation (1/Standard, 2/B-CARD, 3/CVP) dans un modèle d'arrêt cardiaque sous MCE automatisé dans un modèle porcin.

Le modèle animal de cochon est utilisé pour sa similitude avérée, en termes d'hémodynamique et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique chez l'humain. Ce projet utilisera 24 cochons (poids = 50-60kg) permettant ainsi une étude statistiquement exploitable. Ce modèle est maîtrisé par notre équipe et déjà en place dans notre structure. L'arrêt cardiaque en fibrillation ventriculaire (FV) sera réalisé par stimulation électrique interne à l'aide d'une sonde mise en place par le cathéter veineux fémoral. Un stimulus électrique de 9V est appliqué entraînant un arrêt cardiaque en FV. L'animal sera réanimé par massage cardiaque externe (MCE) automatisé par notre dispositif. La durée de massage sera de 60 minutes. L'objectif est de déterminer la méthode de ventilation permettant d'obtenir la meilleure pression de perfusion cérébrale et la meilleure qualité des échanges gazeux (oxygénation et ventilation alvéolaire) dans ces conditions de réanimation.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) assurent le bien-être de l'animal durant la phase expérimentale.

Les bénéfices attendus sont multiples et centrés sur l'amélioration des connaissances sur la ventilation de l'arrêt cardiaque, afin de rendre protocolaires la prise en charge ventilatoire de l'ACR sous massage cardiaque automatisé.

7361 Les synucléinopathies est le terme regroupant différentes maladies neurodégénératives humaines dont la maladie de Parkinson, les démences à corps de Lewy et l'atrophie multisystématisée. La caractéristique commune de ces pathologies neurodégénératives est une accumulation anormale de la protéine α -synucléine sous une forme aberrante dans les cellules du système nerveux central. L'accumulation de l' α -synucléine est impliquée dans la mort des neurones qui est observée dans certaines régions particulières du cerveau chez les patients atteints de ces maladies.

Parmi ces maladies, l'atrophie multisystématisée est une maladie fatale qui ne possède à ce jour aucun traitement curatif. Les symptômes sont caractérisés par des problèmes locomoteurs très lourds et l'espérance de vie du patient est extrêmement réduite une fois le diagnostic établi. Développer des outils thérapeutiques de manière à enrayer le développement de cette maladie fulgurante chez les patients est un enjeu de santé publique majeur aujourd'hui.

Avec cet objectif de trouver de nouvelles voies thérapeutiques, nous nous sommes concentrés sur les lysosomes. En effet, les lysosomes sont des compartiments intracellulaires dont la fonction principale est de nettoyer les cellules en dégradant les molécules, notamment la protéine α -synucléine pathogénique accumulée, ainsi que les déchets cellulaires indésirables. Lorsque leur fonction est perturbée, les déchets s'accumulent dans les cellules nerveuses, ce qui entraîne la mort de la cellule et crée des lésions nerveuses. Depuis ces dernières années, de nombreuses preuves suggèrent qu'un dysfonctionnement des lysosomes à l'intérieur des cellules nerveuses peut contribuer à l'accumulation de l' α -synucléine et donc à terme à la mort des neurones comme observée dans les cas de maladie de Parkinson et d'atrophie multisystématisée.

Des stratégies qui visent à augmenter ou restaurer les fonctions de dégradation des lysosomes semblent donc des thérapies prometteuses pour ces maladies. En adéquation avec cette hypothèse de travail, nous venons de mettre en évidence qu'en augmentant l'expression d'une protéine appelée TFEB, une restauration de la fonction des lysosomes est observée dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson in vivo. Cette restauration entraîne une plus importante dégradation de l' α -synucléine accumulée dans les neurones permettant ainsi d'obtenir un effet neuroprotecteur en diminuant la proportion de perte neuronale dans ces modèles, entraînant alors une moindre sévérité de la pathologie. Ce travail a permis de démontrer, pour la première fois, que la réparation du système de nettoyage cellulaire pourrait être d'un grand intérêt thérapeutique pour les pathologies associées à des dysfonctions lysosomales, telles que la maladie de Parkinson ou l'atrophie multisystématisée.

Ce nouveau projet a pour but de répondre à la question d'un effet neuroprotecteur dans une autre synucléinopathie que représente l'atrophie multisystématisée et donc d'étendre cette stratégie thérapeutique à toute pathologie impliquant une accumulation de la protéine α -synucléine.

L'objectif est de tester si une augmentation d'expression de TFEB induit une augmentation de la fonction lysosomale amenant une plus importante dégradation de l' α -synucléine pathologique et donc des effets neuroprotecteurs mais cette fois-ci dans un modèle animal d'atrophie multisystématisée (voir l'image jointe).

L'impact bénéfique potentiel sur l'accumulation d'alpha-synucléine et donc sur le fonctionnement cérébral et la survie neuronale ne peuvent être évalués que chez l'animal.

Pour se faire, 80 souris divisées en 8 groupes de 10 (voir la table annexe jointe) seront utilisées pour tester cette hypothèse dans un modèle murin d'atrophie multisystématisée et son pendant sauvage. Ce nombre de souris est établi pour obtenir une puissance statistique suffisante lors de l'étude afin de démontrer un réel effet neuroprotecteur induit par TFEB dans ce modèle murin. De plus, nous utiliserons une proportion égale de mâles et femelles afin d'optimiser la reproduction de la lignée nécessaire à cette étude.

Une attention particulière pour le raffinement de nos procédures sera apportée pour limiter, soulager douleur et stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet.

Ce projet transversal est donc d'intérêt pour toute pathologie liée à l' α -synucléine, et permettra donc de démontrer que le lysosome est une cible thérapeutique valide pour les synucléinopathies.

7362 Les pathologies de l'oreille interne, qui vont toucher l'audition et/ou l'équilibre, sont très fréquentes. Leur traitement est rendu compliqué car le principal élément est la cochlée qui est un compartiment fermé. Les médicaments administrés par la bouche ou dans une veine ne peuvent pas atteindre l'oreille interne et sont donc inefficaces. L'administration directement dans l'oreille interne, pourrait donc être une alternative intéressante.

En cancérologie et radiologie, on peut utiliser des nanoparticules pour transporter des médicaments à leur cible. Notre projet a donc pour objectif d'utiliser des nanoparticules aimantées que l'on amènera au centre de la cochlée grâce à un aimant.

L'objectif de notre travail est donc d'étudier avec précision comment se comportent ces nanoparticules dans l'organisme après qu'on les ait déposées dans l'oreille interne : sont-elles éliminées ? à quelle vitesse ? comment (par le sang ?) ont-elles un effet sur l'audition ?

Pour cela, quinze rats « Wistar » adultes femelles seront utilisés. Les trois premiers serviront à mettre en place la technique d'administration dans l'oreille interne grâce à des procédures sans réveil sous anesthésie profonde et les douze suivants à l'étude principale dans laquelle l'audition des animaux sera mesurée sous anesthésie générale avant l'administration des nanoparticules, puis à une semaine, un mois et deux mois après.

A J0, des nanoparticules sur lesquelles nous aurons fixé un atome radioactif (permettant la détection en imagerie) seront administrées à l'entrée de la cochlée. Les nanoparticules seront déplacées dans la cochlée grâce à la mise en place d'aimants positionnés autour du crâne (le positionnement des aimants a été déterminé lors d'une précédente étude).

Afin d'évaluer l'élimination des nanoparticules, des prélèvements urinaires et sanguins et des imageries permettant de localiser les nanoparticules dans l'organisme seront réalisés à un jour, une semaine et un mois après administration (au moment de la mesure de l'audition).

Deux mois après l'injection, nous essaierons de détecter s'il reste encore des nanoparticules dans l'organisme et particulièrement dans l'oreille interne.

La mise en place de cette étude s'est attachée à respecter la règle des 3Rs :

Réduction : nous avons réalisé un travail en amont sur plusieurs cadavres afin de perfectionner la technique et les temps chirurgicaux et ainsi de réduire le nombre total d'animaux utilisés pour optimiser l'étude.

Raffinement : l'étude est longitudinale permettant de suivre dans le temps la population de rats et ne pas procéder à des euthanasies inutiles. De plus, toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie et un protocole analgésique (antidouleur) sera mis en place suite à l'injection.

Remplacement : nous avons remplacé dès que cela était possible le modèle in vivo par des modèles in vitro notamment pour la préparation de l'étude.

Les syndromes myélodysplasiques (SMD) sont des maladies touchant la moelle osseuse et responsables d'un manque de cellules du sang. Le manque de globules rouges (anémie) représente la complication majeure des SMD. L'enjeu de la prise en charge des SMD est de diminuer le nombre de transfusions sanguines pourvoyeuses de complications liées à la surcharge en fer. De nouvelles molécules bloquant la mort des cellules de la moelle osseuse sont en cours de développement. Le Luspatercept (RAP-536) est une de ces nouvelles molécules et a déjà montré un effet positif sur la fabrication des globules rouges.

Actuellement, il n'existe pas de modèle mathématique ou informatique pouvant prédire la réponse des SMD au Luspatercept justifiant le recours à un modèle animal. Dans ce projet, nous allons injecter dans le tibia de la souris les cellules responsables de la fabrication de toutes les cellules du sang associées à une injection de cellules souches mésenchymateuses (cellules qui tapissent les logettes osseuses où sont fabriquées les cellules du sang et qui vont recréer un environnement favorable pour la greffe) provenant du même patient atteint d'un SMD pour créer une souris humanisée mimant la pathologie humaine. Nous avons déjà mis au point dans le laboratoire, ce modèle de souris humanisées. Les souris seront réparties en 2 groupes: 1 recevra le RAP-536 et l'autre non. L'ensemble de ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. De fait, un nombre total de 40 souris sera nécessaire, réparties en 2 groupes de 20 souris pour les greffes primaires puis 80 souris pour les greffes secondaires dont l'utilisation sera dépendante des résultats des prises de greffe primaires. Cette étude nous permettra de valider notre modèle de xéno greffe et de tester un nouvel agent thérapeutique innovant.

7363 L'IRM est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes (T1, T2, densité de protons, coefficient de diffusion, IRM dynamique, IRM fonctionnelle, élastographie, etc.). Ces progrès n'ont pu être réalisés sans d'importants développements méthodologiques. Les spondylarthropathies (SpA) ont une fréquence estimée de 0.3 à 1.9% dans la population humaine. L'atteinte périphérique (notamment du calcaneum qui est un os situé dans le talon) constitue une lésion typique tardive de SpA.

Nous avons précédemment développé une séquence IRM permettant de détecter le fibrocartilage calcaneum de rats atteints de SpA. Cette séquence permet de réaliser des images avec de très fortes résolutions spatiales permettant la détection du tendon de rats de 2-3 mm d'épaisseur. Grâce à cette nouvelle technologie, il est maintenant envisageable d'imager des stades plus précoces de la maladie, tel que l'inflammation.

Pour répondre à cette question, la séquence IRM précédemment développée doit être optimisée et couplée à l'injection de particules de fer. Celles-ci devraient être internalisées par les macrophages de la circulation sanguine et s'accumuler dans la zone inflammatoire.

Pour cela, 10 rats seront utilisés. En effet, chaque rat aura 1 patte arrière arthritique, l'autre patte arrière servira de contrôle. Ces animaux seront imagés par IRM plusieurs fois après l'injection de particules de fer pour détecter l'apparition d'un signal au niveau du tendon au cours du développement de la maladie. Le nombre d'animaux est faible grâce à la non-invasivité de l'IRM, mais suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. L'analgésie sera appliquée dès le début de l'expérimentation (même si la phase aiguë de la maladie n'intervient qu'après 20 jours en moyenne). Des observations et des scorages quotidiens de l'état de l'animal seront pratiqués dès le début de l'expérimentation pour évaluer l'évolution de la maladie. Les points limites spécifiques à la maladie

ont été établis. Les rats seront gardés dans des cages avec des tubes en carton, de la paille, de l'eau à volonté et de la nourriture humidifiée (voire du gel nutritif) placée directement dans la cage. Si certains rats sont en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles.

7364 La lipodystrophie congénitale de Berardinelli-Seip (BSCL) est une maladie rare caractérisée par une absence généralisée de tissu adipeux dès la naissance et une insulino-résistance sévère. La BSCL constitue l'une des formes sévères et précoces de diabète insulino-résistant. Dès le plus jeune âge, les patients développent une intolérance au glucose, un diabète, ainsi qu'une dysfonction cardiaque. La BSCL est transmise selon un mode autosomique récessif. En 2001, des mutations dans le gène BSCL2 ont été découvertes chez des patients atteints de BSCL. Le gène Bsc12 code pour une protéine de fonction encore mal connue, la " seipine ". Nos travaux et d'autres ont pu montrer que la seipine était impliquée dans la différenciation adipocytaire et la survie adipocytaire mais sa fonction exacte demeure inconnue.

Précédemment, nous avons mis en évidence que les souris BSCL2-/- développent une dysfonction cardiaque et celle-ci était corrigée par les gliflozines, une classe d'antidiabétiques hypoglycémifiants.

Notre projet de recherche a deux objectifs :

Comprendre le mécanisme de l'effet cardio-protecteur des gliflozines.

Utiliser un modèle spécifique de délétion de la seipine dans l'adipocyte mature pour comprendre la fonction de la protéine dans ce type cellulaire

Nous nous sommes efforcés de respecter dans ce projet la règle des 3 R. Le projet préconise l'utilisation d'un nombre total de 560 animaux, ce qui, dans un souci de réduction correspond au nombre minimal d'animaux permettant d'obtenir des résultats significatifs. Pour le traitement à la gliflozine, nous avons pu définir grâce à une étude pilote la cinétique minimale de traitement, ce qui nous permet de raffiner le nombre d'animaux et le temps de l'expérimentation. Nous avons pris en compte le bien-être général de l'animal et un examen régulier permettra de prévenir les risques de stress de déshydratation ou d'autres souffrances majeures et visibles. D'autre part, nous avons intégré la gestion de la souffrance de l'animal en utilisant les analgésiques adaptés à chaque procédure. Nos expériences chez l'animal sont indispensables pour observer des réponses physiologiques intégrées mais néanmoins, nous allons effectuer de nombreuses études en cultures cellulaires d'ans l'idée de remplacer tant que possible l'utilisations des souris.

Ce projet a un double objectif de recherche fondamentale, la découverte du rôle de la seipine, et de recherche translationnelle, le fonctionnement des effets cardioprotecteurs des gliflozines.

Nous évaluerons l'efficacité de traitements sur des rétinoblastomes, tumeurs rares de l'œil de l'enfant.

Les tumeurs de l'œil du fait de leur localisation nécessitent des développements thérapeutiques et des protocoles de traitements particuliers. Les essais précliniques dans ce domaine sont rares du fait des difficultés à mettre en place les techniques d'administration et de surveillance nécessaires aux essais chez les petits rongeurs (souris).

Dans un premier temps nous avons utilisé un modèle murin de rétinoblastome se développant dans l'œil de souris immunodéprimées à partir de greffes de cellules tumorales issues de patients atteints de rétinoblastomes. Ce modèle de greffes mime plutôt un envahissant du vitré (en avant de la rétine) et fait l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet. Nous souhaitons maintenant dans un second temps, et ce qui fait l'objet de cette demande, utiliser un autre modèle murin mimant la maladie pour tester nos nouveaux agents potentiellement anticancéreux. Ce modèle a été créé à partir de souris transgéniques pour lesquelles l'ajout d'un gène entraîne l'apparition de rétinoblastomes dans les deux yeux des souris. Ce modèle de tumeur oculaire chez la souris présente plusieurs avantages : il permet de mimer le cancer des patients avec l'apparition de tumeurs dans la rétine, les tumeurs se développent spontanément lorsque la souris est porteuse du transgène ce qui nous permet de les suivre et de les traiter très précocement, il est moins invasif puisqu'il n'y a pas de greffes réalisées et enfin le système immunitaire des souris est pleinement actif ce qui peut permettre une meilleure réponse à un traitement anti-tumoral.

Même si, dans les pays développés, la plupart des enfants guérissent de leur cancer, une majorité d'entre eux se font retirer l'œil (énucléation) pour éradiquer leur cancer perdant ainsi toute acuité visuelle et subissant un traumatisme esthétique. Nous voulons donc trouver de nouveaux traitements et évaluer également l'efficacité et la toxicité dans l'œil de la chimiothérapie pour pouvoir conserver au maximum les yeux des patients (éviter l'énucléation) et guérir leurs cancers.

Nous utilisons plusieurs techniques d'imagerie (IRM, imagerie de l'œil) pour permettre la caractérisation de la croissance tumorale, le suivi de la molécule dans l'organisme ainsi que sa toxicité dans l'œil et son efficacité sur la tumeur. Ces techniques d'imagerie du petit animal, nous permettent d'homogénéiser les groupes constitués en s'assurant que chaque souris a bien une croissance tumorale et de réaliser un suivi dans le temps du même individu quand cela est possible. Ces techniques permettent donc de diminuer le nombre d'animaux utilisés.

En accord avec les réglementations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

Au total nous utiliserons 286 souris porteuses du transgène.

7365 L'asthme allergique est une maladie bronchique inflammatoire fréquente, qui atteint 5 à 10 % de la population. Les corticoïdes contrôlent la maladie, mais induisent des effets secondaires et ne permettent pas toujours de prévenir des exacerbations menant parfois à l'asthme aigu grave et au décès. A long terme, la maladie induit un remodelage bronchique, c'est-à-dire des modifications structurales de la paroi des bronches, qui est à l'origine du déclin de la fonction respiratoire pouvant aboutir à une insuffisance respiratoire chronique.

Pour des soucis pratiques et d'éthique, de nombreuses manifestations liées à l'asthme, qu'elles soient d'ordre cellulaire, moléculaire ou histologique, ne peuvent pas être étudiées chez un patient asthmatique humain. A contrario, le modèle murin présente de nombreux avantages pour l'expérimentation et l'exploration des différents mécanismes pathologiques. Le modèle murin classiquement utilisé dans la littérature scientifique est un modèle de sensibilisation à la protéine majeure du blanc d'œuf, l'ovalbumine (OVA), associée à un adjuvant, l'aluminium. Ce modèle de référence permet d'obtenir chez la souris ainsi traitée toutes les manifestations caractéristiques du phénotype asthmatique : hyperréactivité bronchique réversible, œdème de la muqueuse, éosinophilie sanguine et bronchique et hypersécrétion de mucus. On note cependant que l'inflammation y est temporaire, et ne reflète donc pas l'aspect chronique de la maladie.

Un autre modèle murin d'asthme allergique aigu utilise les allergènes d'acariens pour induire ces mêmes manifestations. Dans les deux cas, la sensibilisation de la souris s'effectue par voie intrapéritonéale. Cependant, cette voie d'administration ne reflète pas la voie naturelle de sensibilisation chez l'homme, celle-ci se déroulant en effet par voie cutanée ou respiratoire.

Afin de faire évoluer les connaissances scientifiques autour des différents mécanismes immunopathologiques liés à l'asthme tout en se rapprochant de l'aspect clinique de la maladie, la mise en place d'un modèle d'allergie basé sur des sensibilisations répétées par voie percutanée avec un extrait d'acariens présente un intérêt important. En effet, la majorité des modèles murins de sensibilisation aux acariens présentés dans la littérature utilise une forme purifiée de l'allergène Der f. Mais l'administration d'un extrait total d'acariens correspond davantage à la voie naturelle de sensibilisation chez l'homme. Alors que l'ovalbumine est une protéine qui est ingérée chez l'homme, la sensibilisation à l'allergène d'acarien se fait par voie cutanée ou par inhalation. Cet allergène est pertinent chez l'homme adulte, ce qui n'est pas le cas de l'ovalbumine. Des résultats montrent que la stimulation bronchique par des allergènes d'acariens chez des souris sensibilisées par voie percutanée induit une éosinophilie pulmonaire et une hyperréactivité des voies aériennes. Notre modèle d'allergie respiratoire aux acariens est obtenu après 4 sensibilisations transcutanées par application sur l'oreille d'un extrait acarien, suivies de 2 challenges intra-nasaux (asthme aigu) ou de 6 challenges (asthme chronique). Ces 2 modèles se caractérisent par une augmentation des résistances respiratoires, une hyperréactivité bronchique, un afflux pulmonaire de cellules inflammatoires et d'éosinophiles, une augmentation du taux d'IgE spécifiques et une production de cytokines de profil Th2.

Ce modèle d'allergie chez la souris est un outil pertinent pour étudier les phénomènes immunologiques impliqués dans la mise en place de l'hyperréactivité bronchique et tester de nouvelles thérapeutiques.

Ce protocole engagera 1920 souris tout en respectant la règle des 3R. Les principes de raffinement et de remplacement contribuent à réduire le nombre d'animaux utilisés tout au long du protocole. Le modèle animal utilisé a été soigneusement conçu et évalué pour permettre de réduire au maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et la précision des paramètres observés selon la règle des 3R. De même, les animaux seront hébergés par groupe de 3-5 souris/cage afin de favoriser la vie sociale. De plus, des objets sont rajoutés dans chacune des cages pour contribuer au bien-être de l'animal. Les animaux seront régulièrement observés pour prévenir à toute souffrance éventuelle.

7366 L'accident vasculaire cérébral (AVC) est la 3ème cause mortalité et la première cause de handicap acquis chez l'adulte dans les pays industrialisés (OMS, 2012) posant un problème majeur tant dans le domaine de la santé publique que sur le plan humain. Actuellement, la prise en charge des patients à la phase aigüe de l'infarctus cérébral est réalisé par injection intraveineuse de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) associée ou non à la thrombectomie. Toutefois, seule une faible proportion des patients (<10%) peut être traité du fait des effets secondaires de l'injection de tPA et de la relative difficulté d'accès à la thrombectomie. Ainsi, il paraît indispensable que de nouvelles stratégies thérapeutiques soit mises en place.

Cependant, il existe un problème de translation des résultats obtenu en laboratoire vers la clinique, ce qui peut remettre en cause la pertinence des études précliniques et des modèles animaux utilisés dans la recherche sur l'AVC. Un grand nombre de facteurs peut expliquer ce décalage (manque de diversité génétique, animaux jeunes et en bonne santé, pas ou peu de facteurs de risques associées etc...). Un de ceux-ci est l'anesthésie, qui possède des effets neuroprotecteurs et modifie un grand nombre de paramètres physiologiques ; ce qui perturbe et interfère avec l'évolution de la pathologie.

L'objectif de ce projet est d'augmenter la fiabilité des études précliniques en s'affranchissant des multiples effets de l'anesthésie dans un modèle préclinique d'infarctus cérébral mimant au mieux la physiopathologie humaine. Pour répondre à notre problématique le modèle d'ischémie thromboembolique sera utilisé. Ainsi, cette étude sera réalisée chez la souris puisque ce modèle a été développé et caractérisé chez la souris. Ce projet, va se dérouler en 2 étapes. Dans un premier temps, il s'agira de mettre au point un modèle d'ischémie thromboembolique cérébrale focale chez la souris vigile. Le protocole de mise au point et de caractérisation du modèle nécessitera 180 souris. Les procédures seront organisées afin que toutes les manipulations douloureuses soient réalisées sous anesthésie générale et couverture analgésique et que seule la procédure d'occlusion vasculaire soit réalisée sous anesthésie locale avec une couverture analgésique.

Dans une seconde phase, nous étudierons l'efficacité de la fibrinolyse par le rt-PA (molécule de référence utilisée en clinique) ainsi que celle d'un traitement neuro-protecteur Glunomab® en phase de développement préclinique dans notre modèle. Cette partie du projet nécessitera 150 souris répartis dans les différents groupes expérimentaux.

Cette étude basée sur l'expérimentation animale prend en compte le bien-être animal et les pratiques éthiques, et répond à la règle des 3 R (remplacer, réduire, raffiner) comme décrit ci-dessous : La souris est une des espèces animales les plus étudiées dans le domaine de l'AVC. Le modèle in vivo est indispensable afin de pouvoir vérifier les effets de l'anesthésie. Dans ce contexte, ce modèle n'est pas remplaçable. L'ensemble des connaissances et des acquis dont nous disposons dans la littérature rend cette espèce particulièrement intéressante pour étudier l'effet de l'anesthésie sur les lésions cérébrales. Notre projet ne nous permet pas d'utiliser d'autres moyens que de tester notre modèle chez l'animal. Une étude de puissance statistique en amont, permet de nous assurer que nous utilisons le nombre minimal d'animaux pour atteindre le résultat souhaité. Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les animaux sont hébergés dans des cages standards aux normes européennes suite à la chirurgie. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés jusqu'à l'euthanasie de l'animal.

7367 La leucémie dérivée des cellules dendritiques plasmocytoïdes (LpDC) est un cancer du sang (dit hématopoïétique) touchant majoritairement les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDC). La LpDC est une maladie rare (1% des leucémies aiguës) touchant environ 100 nouveaux patients par an en France. Les rechutes précoces, et les résistances aux traitements, sont fréquentes malgré une rémission complète après un premier traitement par chimiothérapie.

Les pDCs sont un sous-type de cellules dendritiques du système immunitaire. Elles sont les seules cellules de l'organisme exprimant spécifiquement et fortement le récepteur CD303.

Parmi les alternatives thérapeutiques envisagées de la LpDC, l'administration d'une molécule thérapeutique capable de reconnaître spécifiquement ce récepteur CD303 permettrait d'éliminer ce type cellulaire avec une grande efficacité et une meilleure tolérance. Différents anticorps monoclonaux anti-CD303 ont donc été produits et un seul sélectionné. Ce dernier qui, en se fixant spécifiquement aux récepteur CD303 humain, rend les pDCs sensibles à une élimination par le système immunitaire.

Le premier objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité (type de réponse, durée et amplitude) de cet anticorps pour le traitement de la LpDC dans un modèle animal. Nous utiliserons pour cela un modèle rongeur qui exprime, après modification génétique, le récepteur CD303 humain sur les pDCs de ce modèle. L'efficacité de l'anticorps testé est évaluée par la détermination du taux de pDCs dans des prélèvements sanguins, et dans divers organes (rate, foie et moelle osseuse), durant une période d'exploration définie après administration de l'anticorps.

En parallèle, nous utiliserons ce même modèle de rongeur pour étudier l'évolution après administration de la concentration de cet anticorps et faire un lien entre la concentration du produit et l'efficacité observée. Plusieurs prélèvements sanguins sont nécessaires pour caractériser au mieux l'évolution de sa concentration en fonction du temps.

Ces études permettront de préparer les éléments réglementairement requis pour démontrer l'efficacité et la sécurité de cet anticorps avant tout essai clinique chez l'homme.

Les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins scientifiques. Dans le cadre de ce projet le nombre maximal de rongeurs nécessaire est de 2520 pour une durée de 5 ans ce qui permettra de tester le candidat médicament. Ce nombre a été réduit au minimum nécessaire afin de garantir la validité des résultats. Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque injection afin de réduire la souffrance des animaux. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe associé à des éléments d'enrichissements permettent d'assurer leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général, mobilité et poids) tout au long de l'expérience. Dans le cas où des signes cliniques de souffrance apparaîtraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou, si ces signes correspondent à des critères d'arrêt de l'expérimentation définis lors de la conception du projet, de procéder à une euthanasie.

7368 L'objectif de ce projet est de mesurer de façon la plus précise possible les nutriments digérés et/ou métabolisés par l'animal et ceux rejetés dans les fientes. Cela permet de faire un « bilan » c'est-à-dire de quantifier le pourcentage de chaque nutriment réellement disponible (par la mesure de sa digestibilité) pour l'entretien, la croissance ou la production de l'animal ou à l'inverse, excrété dans l'environnement. Mesurer de manière précise la digestibilité des aliments, qui est variable selon les matières premières ou les procédés, permet de les adapter au mieux aux besoins des animaux et de réduire les rejets dans l'environnement.

Pour ce projet, 72 poulets sont utilisés par essai. 8 traitements peuvent être testés sur 9 poulets.

Un maximum de 8 essais par an pourra être réalisé, selon les engagements dans les programmes de recherche et les demandes de la filière. Ainsi le nombre total prévisionnel est de 2880 animaux maximum (8 essais/an x 5 ans).

Ils sont élevés dans une salle équipée de cages collectives (L174, I51, h76 cm, soit 0,88 m² de surface), les animaux seront logés par groupe de trois. La surveillance journalière (y compris les week-ends) avec la visite de l'animalier plusieurs fois par jour, permettent une habitude rapide des animaux à la présence humaine. Les animaux sont élevés en conditions de température, de lumière et d'hygrométrie adaptées à leur stade physiologique.

Les animaux seront hébergés par groupe de trois pendant les trois premières semaines d'essai et placé en hébergement individuel pour la semaine de bilan.

Les données ainsi obtenues permettent de générer des bases de données, modèles ou équations qui réduisent in fine l'utilisation des animaux.

Remplacement : Seule l'évaluation sur animaux permet de mesurer avec précision la valeur nutritionnelle et le niveau de rejets d'un aliment. La mesure chez l'espèce d'intérêt agronomique, "poules" (*Gallus gallus*), permet d'approcher au mieux les réponses en élevage.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé a été réduit au minimum de répétitions, nombre calculé de manière à être capable de mettre en évidence un écart de 3 % de valeur énergétique (sur la base de nos propres résultats), niveau suffisant d'un point de vue biologique et zootechnique.

Raffinement : ce projet diminue la période d'hébergement individuel des poulets au profit d'une période plus importante en hébergement collectif (groupe de 3) par rapport à l'ancienne demande d'autorisation de projet. Par ailleurs, un objet d'enrichissement (chaîne avec anneau métallique pendu côté mangeoire) est installé dans chaque cage pour leur donner la possibilité de s'occuper.

7369 Les douleurs neuropathiques et pathologiques chroniques sont en général consécutives à des lésions du système nerveux. Dans leur grande majorité, ces douleurs sont insensibles aux principaux analgésiques tels que l'acide acétylsalicylique (aspirine), le paracétamol, l'indométacine, les dérivés morphiniques et les benzodiazépines. Ces douleurs sont liées à des perturbations de l'équilibre fonctionnel des structures nerveuses spinales et supraspinales contrôlant le nociception. Il apparaît donc évident que les composés à découvrir pour la pharmacothérapie des douleurs neuropathiques et pathologiques chroniques devraient nécessairement être de puissants modulateurs de l'activité des réseaux de neurones nociceptifs spinaux et supraspinaux. Diverses pistes sont explorées parmi lesquelles la voie de l'acide gamma-amino-butyrique (GABA) qui est le principal neurotransmetteur inhibiteur du système nerveux central. Pour l'instant, les essais cliniques réalisés avec les agonistes classiques des récepteurs GABAA et GABAB n'ont pas donné de résultats satisfaisants dans le cadre des douleurs neuropathiques sévères.

Diverses observations laissent penser que les neurostéroïdes pourraient constituer une piste intéressante à explorer pour le contrôle des douleurs rebelles. En effet, les neurostéroïdes modulent l'activité des cellules nerveuses préférentiellement via des récepteurs membranaires tels que les récepteurs GABAA, NMDA et P2X qui sont impliqués dans la transmission nociceptive. De plus, il a été montré que certains neurostéroïdes tels que les dérivés 5alpha/3alpha-réduits de la progestérone sont des anxiolytiques endogènes ne provoquant pas d'effets secondaires.

Pour établir une adéquation pertinente entre les résultats expérimentaux et les symptômes de douleurs neuropathiques observés chez l'humain, nous utiliserons comme modèle animal de neuropathie celui de ligature lâche du nerf sciatique chez le rat. Ce modèle est connu pour créer chez l'animal les douleurs neuropathiques observées chez l'Homme.

Le principal but de ce projet est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre les causes de souffrance axonale. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies, d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la neuroprotection. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa. Les modèles animaux (rat) développés se font dans le respect des règles de 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (6-8 animaux pour les groupes expérimentaux et 4 animaux pour les groupes naïfs et sham. Raffiner : les protocoles sont optimisés et les expériences ne sont répétées qu'une fois. Remplacer : les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures de cellules. C'est ainsi que nous avons développé la culture cellulaire provenant des ganglions rachidiens pour appréhender les mécanismes mis en jeu au cours de l'apparition des neuropathies. Les animaux sont surveillés tous les jours et les signes cliniques de souffrance sont évalués (posture,

aspect du poil, alimentation et poids). L'euthanasie des animaux est réalisée par des méthodes appropriées et autorisées et des personnes expérimentées (niveau II minimum).

Les objectifs du projet sont:

Utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie

Mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour tester des substances neuroprotectrices

Permettre le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa.

L'effectif global pour ce projet sera de 1080 rats sur 5 ans.

7370 Les études épidémiologiques réalisées sur des cohortes de personnes irradiées lors d'une radiothérapie pour un premier cancer, ou suite à une contamination par les iodures radioactifs, comme lors de l'accident de Tchernobyl, montrent que :

Le risque de développer un cancer de la thyroïde est augmenté, si l'exposition se produit pendant l'enfance, pour des doses de radiation ionisante (RI) à la thyroïde supérieure à 100mGy,

Le nombre de cancers diagnostiqués au cours des décennies qui suivent l'exposition augmente proportionnellement avec la dose reçue.

Pour des doses de RI inférieures à 100mGy, nous ne savons pas formellement si l'exposition entraîne un excès de cancers dans la population exposée. En effet, le risque ne peut pas être déterminé par l'épidémiologie conventionnelle: si des cancers sont induits par l'exposition à de faibles doses de RI, l'excès de cancers sera trop faible pour pouvoir être mesuré de façon significative en comparaison du nombre de cancers spontanés de la thyroïde se développant avec l'âge dans une population non exposée.

Cependant, depuis une dizaine d'années, la population générale est plus fréquemment exposée à des expositions à ces faibles doses de RI en raison de l'augmentation de l'imagerie pour le diagnostic, y compris chez l'enfant, ou dans le cadre d'activités professionnelles.

Néanmoins, l'effet biologique des faibles doses/faibles débits de dose de RI est encore mal documenté en général et en particulier pour la thyroïde. La compréhension de l'impact des faibles doses/faibles débits de dose sur la santé publique, en particulier pour le développement de cancers radio-induits, nécessite d'analyser la séquence des événements moléculaires de la réponse du tissu à court, moyen et long termes après exposition aux RI. En effet, l'apparition de cancers suite à une irradiation suit un processus séquentiel qui peut s'étaler sur plusieurs années.

Pour comparer l'impact biologique des fortes et des faibles doses/débits de doses à court terme et moyen termes, nous avons développé, et continuons de développer, des approches *in vitro*. Néanmoins, aucun de ces modèles ne permet d'observer les effets biologiques de l'exposition aux RI sur une période de plus de 3 mois.

Pour réaliser des analyses sur le long terme, nous souhaitons développer une approche basée sur des transplantations de tissu humain ou de primates non humain (PNH) de la thyroïde dans un modèle rongeur immuno-déficient. Ce modèle de xénogreffe, décrite dans la littérature scientifique, permet de maintenir un greffon de tissu de thyroïde humaine dans un microenvironnement physiologique pendant plusieurs années (3 ans dans les études publiées).

Ce modèle permettra :

D'analyser les effets d'une irradiation ionisante sur l'histologie du tissu humain.

D'obtenir du tissu humain exposé pour une recherche de marqueurs d'exposition et/ou de marqueurs précoces de cancérogenèse en relation avec le niveau d'exposition, plusieurs années après l'irradiation.

Le déroulement de ce projet sera réalisé en plusieurs phases. Une première étude sur 1 an pour analyser les effets biologiques de deux à cinq doses d'irradiation. En fonction des résultats, nous mènerons alors une seconde étude à plus long terme (3 ans) avec deux doses sélectionnées. Une troisième étude sera réalisée à l'issue de ce suivi pour obtenir du matériel biologique en quantité

suffisante et réaliser une analyse des marqueurs biologiques. Le matériel biologique obtenu au cours de ces analyses sera stocké et utilisé dans le cadre d'un projet collaboratif. Le nombre d'animaux est estimé à 319.

Dans les procédures, les interventions sur les animaux (chirurgie, prélèvement de sang) prévoient un traitement anti-douleur systématique. Le greffon en lui-même ne devrait pas gêner la vie de l'animal. La bonne santé des animaux est essentielle à la réalisation du projet et l'interprétation des résultats. Si un animal apparaît souffrant, en conséquence de la procédure ou pour une autre raison, il sera euthanasié. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettront de garantir le bien-être des animaux. Le vétérinaire de l'installation sera alerté dès le moindre signe de souffrance pour mettre en œuvre des traitements appropriés ou décider d'une euthanasie.

7371 Contexte :

Le projet a pour but de développer de nouveaux traitements contre l'otite externe chez le chien et le chat. L'otite externe est une maladie courante chez le chien et le chat qui peut être due à une infection bactérienne et/ou fongique.

Objectifs :

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'efficacité et l'innocuité de nouveaux candidats-médicaments contre l'otite externe chez le chien et le chat.

La finalité de ce projet est de pouvoir proposer aux propriétaires des soins optimaux pour leurs chiens et chats souffrant d'otite externe.

Avantages et dommages :

Les dommages induits par les procédures peuvent être de l'inconfort, une légère douleur liée à l'otite externe, du stress et une gêne liée aux administrations de produits et aux prélèvements répétés.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce cible (le chat ou le chien) suivant les exigences réglementaires. Jusqu'à 520 chiens et 350 chats sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement : Les études in vivo permettent de déterminer, pour le produit testé, l'absorption tissulaire, le métabolisme, l'évolution des expositions tissulaires et plasmatiques ainsi que de confirmer l'activité du produit sur les manifestations cliniques. Ainsi, il est nécessaire d'avoir recours à l'espèce cible, pour discriminer et caractériser de façon certaine les produits candidats, futurs médicaments.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre minimum d'animaux requis est déterminé par les textes. Lors des phases de recherche, les effectifs sont souvent réduits par rapport aux études réglementaires et déterminés (bibliographie, guidelines, historique, définition des objectifs...) de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant une approche rigoureuse et ceci afin d'éviter les études non conclusives.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des animaux est prévue dans le but de limiter leur stress. Une surveillance adaptée est mise en place pour assurer une prise en charge rapide des animaux si cela s'avérait nécessaire. En cas de douleur liée à l'otite, des anti-inflammatoires non stéroïdiens ou des opioïdes pourront être administrés. En cas d'administrations et/ou de prélèvements répétés, une anesthésie et/ou analgésie peuvent être mis en place. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour garantir leur confort et leur bien-être. Les animaux ont à disposition des méthodes d'enrichissement afin de stimuler l'exercice physique et leurs activités cognitives.

7372 L'administration d'un nouveau médicament à l'homme pour la première fois nécessite de s'assurer de son innocuité et de sa bonne tolérance à la dose utilisée. Pour cela, des études préalables sont requises. Ces études ont pour but de documenter les effets secondaires potentiels du produit testé sur les grandes fonctions de l'organisme ainsi que sa bonne tolérance au niveau du site

d'administration. Les données ainsi recueillies, associées aux paramètres pharmacocinétiques du produit, servent à calculer la première dose administrée à l'homme en toute sécurité. Il s'agit là d'une exigence réglementaire.

Les procédures expérimentales décrites dans ce projet consistent à étudier le profil toxicologique d'une nouvelle entité chimique et/ou biologique chez l'animal de laboratoire. Elles consistent à administrer le candidat médicament par voie orale, locale (par dépôt) ou parentérale (par injection) à des animaux de laboratoire et à observer les signes cliniques potentiels ainsi que les modifications biologiques éventuelles associées. Les administrations peuvent être uniques ou répétées dans le temps. Lorsqu'elles sont répétées, les doses peuvent être fixes ou croissantes. Les données recueillies permettent de caractériser le comportement toxicologique du produit testé, d'identifier les tissus et organes cibles, de calculer la première dose qui sera utilisée chez l'homme ainsi que les conditions d'administration ou encore d'éclairer un effet indésirable observé lors d'une étude clinique.

Le bénéfice attendu de ce projet est considérable dans les étapes de Recherche et Développement d'un nouveau médicament car il va permettre de déterminer les conditions optimales d'administration du produit chez l'homme de façon à garantir sa sécurité d'utilisation. Les procédures expérimentales mises en œuvre concernent un nombre réduit d'animaux de laboratoire et viennent en complément d'informations d'activité et de toxicité recueillies au travers d'études in vitro ou par le biais de modélisation informatique.

Il n'est pas possible de remplacer l'entièreté des études de toxicologie conduites chez l'animal de laboratoire par des tests in vitro car certaines études considèrent l'ensemble des interactions anatomiques et fonctionnelles présentes dans un organisme vivant complet. Ces études viennent en complément de modèles expérimentaux cellulaires ou mathématiques mis en œuvre plus précocement dans le développement et qui permettent de réduire l'utilisation d'animaux de laboratoire mais pas de les remplacer totalement. La réduction du nombre d'animaux s'opère également au travers des plans d'études optimisés (par exemple doses croissantes effectuées sur les mêmes animaux), ou encore du choix de prélèvements sanguins de très faible volumes qui sont réalisés de façon séquentielle sur les mêmes animaux et qui limitent ainsi l'effectif total de l'étude. L'habituation des animaux pendant les phases d'acclimatation, l'utilisation d'une anesthésie pour certaines administrations, l'enrichissement du milieu (ex : tunnels ou igloo pour les rongeurs, balles pour les chiens et les porcs, ...) et une surveillance particulière de leur comportement tout au long de l'étude sont autant de moyens de raffinement mis en œuvre.

Le nombre d'animaux nécessaire est déterminé en fonction du schéma expérimental requis pour atteindre les objectifs de l'étude, dans le respect des exigences réglementaires associées aux activités de toxicologie. Un effectif maximal de 9975 animaux sur 5 ans (4100 souris, 4400 rats, 300 cobayes, 300 hamsters, 300 lapins, 325 porcs et 250 chiens) est nécessaire pour la conduite de ce projet.

7373 La reconstruction des pertes de substances osseuses segmentaires en contexte carcinologique reste un challenge. Les greffes d'os autologues revascularisées (lambeaux libres osseux) sont le traitement de référence. Ces procédés chirurgicaux complexes ne sont pas toujours réalisables en raison de contre-indications d'ordre anatomique, vasculaire, médicale.

A la fin des années 90, le docteur Masquelet a décrit la technique des membranes induites pour la reconstruction de pertes de substances osseuses segmentaires des os longs en cas d'échec des procédures conventionnelles. Deux interventions chirurgicales successives sont nécessaires. Cette technique pourrait avantageusement être utilisée pour la reconstruction osseuse en contexte carcinologique avec greffe d'un biomatériau.

Le but de ce projet est de comparer l'efficacité de la greffe de 3 biomatériaux différents au sein d'une membrane induite créée au niveau du fémur de rats par un conformateur en ciment chirurgical (PMMA) ou en silicone. Cette étude serait réalisée chez le rat Wistar (8 rats par condition soit 32 rats), avec 4 conditions différentes de comblement : matériau 1 (groupe A), matériau 2 (groupe B), matériau 3 (groupe C), pas de comblement (groupe D). Les rats des groupes A, B et C seraient irradiés entre les deux chirurgies à la dose de 50 Grays en 25 fractions de 2 Grays pendant 5 semaines.

Tous les rats seraient euthanasiés 8 semaines après la chirurgie n°2. Les fémurs seraient récupérés pour analyse radiographique par microscanner (densité osseuse) et analyse histologique (quantité d'os néoformé).

Remplacer: Ce projet s'intègre dans un projet global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique à l'implantation in vivo. Le matériau a été testé in vitro sur des lignées cellulaires de rats et in vivo en implantation en site osseux fémoral dans les condyles. Cette dernière expérimentation vise à l'implanter en site osseux fémoral dans une perte de substance segmentaire. Raffinement: Prise en compte de la douleur par l'utilisation d'analgésiques à doses appropriées, suivi post-opératoire avec des points limites suffisamment prédictifs, enrichissement du milieu d'hébergement, suivi quotidien des animaux. Réduire: Pour n'utiliser que le nombre d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 8 animaux par condition est nécessaire soit 32 rats.

7374 Tout expérimentateur amené à travailler sur l'animal de laboratoire doit acquérir, entretenir ou perfectionner ses compétences techniques. Ce projet est dédié à l'entraînement du personnel sur les gestes nécessaires à la bonne réalisation des procédures expérimentales des projets. Ces gestes sont acquis à l'occasion de formations, animées par des formateurs soit internes à l'entreprise (transmission des compétences, tutorat) soit externes (nouvelles techniques, harmonisation des méthodes d'administration et de prélèvement...). Ce projet s'inscrit dans l'obligation réglementaire décrite dans l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques.

Il contribue, par la mise en place de formations pratiques au sein de l'établissement, à la compétence du personnel dans le cadre de la formation continue.

L'utilisation d'un animal vivant est nécessaire pour un bon apprentissage et pour être au plus près des conditions expérimentales réelles.

Un entraînement régulier et une bonne compétence du personnel, contribuent à une réalisation efficace des études, augmentant la fiabilité des résultats, et respectant le bien-être animal par la pratique de gestes maîtrisés.

Le type de geste étudié lors des ateliers est choisi et adapté en fonction des besoins d'apprentissage et/ou de perfectionnement pour des études spécifiques et adapté aux futures études de pharmacologie prévues.

Les espèces animales utilisées pour chaque formation sont ciblées et en adéquation avec les activités réelles de chaque expérimentateur. Ce projet décrit ainsi les conditions d'entraînement et de formation sur les espèces souris, rat, cobaye, lapin et porc.

Le nombre d'animaux nécessaires à l'acquisition du ou des gestes sera évalué en fonction du besoin d'apprentissage et choisi au strict minimum nécessaire. Afin de réduire ce nombre, la réutilisation d'animaux issus d'un premier projet et n'ayant que peu ou pas ressenti de stress ou de douleur sera toujours privilégiée, (témoins, ...) dans la stricte condition de leur bon état général. Les animaux pourront également dans certaines conditions être utilisés à l'occasion de plusieurs sessions de formation, en fonction du type de geste et toujours dans la mesure de leur bon état de santé.

Les techniques d'administrations par les principales voies ou autres gestes simples et non stressants pourront être réalisées chez l'animal vigile.

La plupart des gestes de prélèvements sanguins ainsi que les gestes pouvant générer un stress, du fait du caractère d'entraînement seront réalisés sous anesthésie et potentiellement analgésie.

Tous les animaux bénéficient de conditions d'hébergement enrichies spécifiquement pour chaque espèce, favorables à l'expression de leurs instincts (nidification, jeu, fouissage, ...) et adaptées à leurs besoins. Ils font l'objet d'une surveillance particulière lors des phases de maintien entre chaque session. Une attention particulière sera portée également à la fréquence et aux volumes de prélèvements ainsi qu'aux temps de récupération recommandés (A Good Practice Guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. J. Appl. Toxicol.

21, 15–23 (2001)). Des points limites prédéfinis seront mis en application en cas de dégradation de leur état général.

On peut estimer à environ 150 souris, 100 rats, 50 cobayes, 50 lapins et 10 porcs le nombre d'animaux nécessaires pour toute la durée du projet, soit 5 ans, dans le cadre de la formation du personnel de notre établissement utilisateur.

7375 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie dégénérative inflammatoire chronique qui est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. Il s'agit du plus fréquent des rhumatismes inflammatoires de l'adulte avec une prévalence de 0.4% en France. La polyarthrite rhumatoïde est une pathologie complexe dont il est évident que l'étiologie est multiple. Une prédisposition génétique et la contribution de facteurs environnementaux et infectieux sont fréquemment incriminés. Les facteurs environnementaux, dans la mesure où ils sont modifiables, offrent des leviers intéressants d'intervention possible sur la pathologie. Ils sont de plusieurs ordres : on retrouve par exemple le facteur « stress » puisqu'il est estimé que plus de 50% des patients souffrant de douleur chronique expriment des signes de dépression. La composante alimentaire est également à prendre en compte car certains aliments tel que le gluten sont capables de modifier les processus anti-inflammatoires. De même le rôle du microbiote intestinal dans l'étiologie de la pathologie est de plus en plus suggéré comme important. La réponse immunitaire de l'organisme semble en effet être fortement influencée par le microbiote intestinal. De même, de nombreux patients atteints de polyarthrite souffrent de douleurs abdominales, pouvant s'expliquer par une altération métabolique du microbiote intestinal. Cela impose donc d'intégrer l'axe tube digestif / articulations dans le questionnement. Ce travail devrait notamment permettre de mettre en évidence les groupes bactériens susceptibles d'être impliqués dans le processus d'inflammation chez les personnes souffrant de polyarthrite rhumatoïde, et à terme, de mettre en place des stratégies thérapeutiques visant à moduler le microbiote intestinal. Le volet in vivo de ce projet sera conduit sur un modèle de polyarthrite induite par injection de collagène de type II bovin 1/chez le rat mâle gnotobiotique Sprague-Dawley (OFA) et 2/ le rat mâle Sprague-Dawley (OFA) conventionnel traité aux antibiotiques, ces animaux ayant reçus au préalable le microbiote fécal d'un patient souffrant de polyarthrite rhumatoïde ou celui d'un volontaire sain. Un maximum de 480 rats seront utilisés dans ce projet. Ce modèle d'étude permet d'appréhender le développement de la pathologie arthritique et sa potentielle modulation par le microbiote intestinal, ce qui n'est possible que sur un organisme vivant pris dans sa globalité.

Ce projet se déroulera dans le cadre de la règle des 3Rs, ainsi le nombre d'animaux par lot a été déterminé afin de permettre une exploitation statistique des résultats (ANOVA) tout en réduisant le nombre d'animaux utilisés. Tout au long de l'expérimentation, une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux (anesthésie, analgésie, points limites...).

7376 Les cathéters intracardiaques permettant la cartographie (diagnostic) et le traitement curatif par thermo-ablation myocardique des régions arythmogènes sont des dispositifs centraux dans la prise en charge des patients souffrant de pathologies cardiaques.

De nombreux progrès ont déjà été réalisés ces dernières années pour améliorer les fonctionnalités des cathéters intracardiaques (mesures multipoints, stimulations électriques, thermothérapies, systèmes de navigation embarquée temps réel, compatibilité IRM...), mais de nombreuses avancées technologiques permettent d'améliorer encore leurs fonctionnalités, permettant un diagnostic et un traitement plus rapide, plus sûr et plus efficace.

Plusieurs industriels collaborent étroitement avec les équipes de recherche de notre structure pour la mise au point de ces instruments et leur interfaçage avec des consoles d'analyse et de traitement intégrant les données multimodales (mesures électriques, données anatomiques et fonctionnelles investiguées par imagerie IRM, scanner RX et ultrasonore).

Leur utilisation chez le patient est conditionnée à une évaluation préalable en conditions proches de la clinique permettant d'évaluer leur ergonomie (manipulation effective par un clinicien), leurs fonctionnalités (aspects balistiques, cartographie électrique 3D, imagerie, ...), leur efficacité (capacité à diagnostiquer précisément une région pathologique, capacité à induire une lésion transmurale) et

de garantir l'absence de complications (perforation cardiaque, lésions extra-cardiaques). Pour atteindre ces objectifs, il est essentiel de corréliser les données obtenues in vivo sur un modèle animal avec des données anatomiques (imagerie) et fonctionnelles (cartographie électrique) obtenues avant et/ou après la procédure. Enfin, les lésions induites, quel que soit l'énergie utilisée, vont se remanier après la période aiguë de l'intervention. On estime qu'elles sont définitives et fixées à environ 3 mois. C'est la raison pour laquelle nous devons réétudier certains animaux à 2/3 mois.

De par leurs caractéristiques anatomiques et leur métabolisme proche de ceux de l'homme, les espèces du porc et de l'ovin ont été identifiées comme les meilleurs modèles pour le projet. A ce jour il n'est pas possible de REMPLACER le modèle animal et les études in-vivo dans le cadre de ce projet.

Nous avons fixé une limite maximale de 50 moutons et/ou porcs au total par an pour une période de 5 ans (50 animaux/an pendant 5 ans soit 250 animaux). Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable. Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent d'enrichissements adaptés (foin et pierre à sel)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

7377 Les accidents vasculaires cérébraux constituent un véritable problème de santé publique et malgré une prise en charge standardisée les thérapeutiques sont peu efficaces, notamment celles pouvant apporter une neuroprotection aux cellules à risque se situant dans la pénombre ischémique. Durant ces dix dernières années, de nombreux travaux ont souligné le potentiel neuroprotecteur des gaz rares, dont le Xenon qui est le gaz noble de référence. Cependant l'application du Xénon en pratique clinique est compromise par sa rareté et son coût de production élevé. Nous avons contribué à démontrer qu'un autre gaz rare, l'argon, troisième constituant de l'atmosphère terrestre et donc bon marché, constitue une alternative prometteuse au Xenon. En utilisant un modèle d'ischémie transitoire par occlusion de l'artère cérébrale moyenne (OCAM) chez le rat, nous avons observé un effet neuroprotecteur durable de l'inhalation d'Argon à 50% associé à 50% d'oxygène. L'effet neuroprotecteur se traduit par une amélioration des fonctions neurologiques et ce jusqu'à deux semaines après l'OACM. Ces résultats ouvrent une fenêtre pour une intervention thérapeutique, mais nécessitent au préalable d'être validés sur un modèle animal anatomiquement et physiologiquement plus proche de l'homme. Dans cette perspective, notre projet a pour objectif de tester les effets neuroprotecteurs de l'argon sur un modèle de lésion ischémique chez le singe macaque Rhésus. Ce projet est organisé en 2 parties.

La première partie du projet consiste en la réalisation d'un modèle d'ischémie cérébrale chez le singe rhésus et la caractérisation de ses conséquences neurologiques dans la période post-ischémique. Elle reposera sur une étroite collaboration entre cliniciens et chercheurs en neurosciences en vue d'utiliser des techniques de pointe en imagerie, en électrophysiologie et en histologie pour une analyse exhaustive du modèle d'ischémie. La seconde partie du projet portera sur l'utilisation de ce modèle pour évaluer les effets neuroprotecteurs de l'argon aux niveaux clinique et structurel. Seize singes macaque rhésus seront utilisés dans ce projet. Les 4 premiers macaques permettront de valider le modèle d'ischémie cérébrale ainsi que l'évaluation quantitative de ses conséquences. Les 12 autres macaques seront divisés en 2 groupes expérimentaux de 6 animaux: un groupe contrôle

pour l'étude de la récupération fonctionnelle spontanée suite à l'ischémie et un groupe "Argon" pour l'analyse des effets neuroprotecteur de l'inhalation de ce gaz au cours de la période péri-ischémique.

Afin de s'inscrire dans la règle des 3Rs, le nombre d'animaux impliqués dans le projet a été estimé statistiquement afin de garantir la validité des résultats attendus. Par ailleurs, toutes les mesures seront prises pour réduire le stress et la souffrance des animaux. Le protocole d'ischémie vise à produire une lésion corticale de taille limitée et produisant un déficit sensorimoteur unilatéral et sans douleur, évoluant rapidement vers une récupération fonctionnelle spontanée des fonctions sensorimotrices. Les animaux seront placés dans un environnement enrichi en présence de congénères pour favoriser cette récupération et encourager les interactions sociales. Toutes les procédures seront réalisées sous contrôle vétérinaire et pourront être interrompues s'il est jugé que le niveau de bien-être des animaux est insuffisant.

7378 Depuis plus de trente ans, la recherche sur la maladie d'Alzheimer (MA) bénéficie de modèles de souris génétiquement modifiées qui ont notamment permis de progresser dans la compréhension du développement des deux principales marques de la maladie : l'accumulation de protéine tau anormale et celle du peptide amyloïde dérivé de la protéine précurseur du peptide amyloïde (APP). La majorité de ces souris sur-expriment des gènes APP et/ou tau humains qui contiennent des mutations rares induisant ces accumulations amyloïdes et/ou tau chez l'Homme. Ces modèles présentent néanmoins des limites notamment liées à la présence du gène APP et du gène tau de la souris et à la surexpression des gènes humains qui augmente anormalement les taux de toutes les formes de protéine dérivées de ces gènes en plus de celles induisant des lésions de type Alzheimer. De plus, la majorité de ces modèles de surexpression de gène humain ne présentaient que peu de perte de neurones, une caractéristique pourtant marquée et essentielle dans la MA. Dans le but d'améliorer les modèles de recherche, de nouvelles lignées de souris ont été créées récemment avec la méthode du « knock-in » qui permet le remplacement du gène de la souris par un seul exemplaire du gène humain. Il existe désormais des souris knock-in ayant un gène de l'APP avec deux mutations humaines (APP KI) et d'autres avec un gène humain normal de tau (tau KI). Le but de ce projet est de caractériser chez ces souris les tout premiers troubles de la mémoire et les régions cérébrales porteuses d'anomalies du fonctionnement à l'origine de ces troubles chez les souris APP KI, les souris tau KI et aussi les souris APP KI x tau KI issues de leur croisement qui exprimeront donc la protéine APP humaine mutée et la protéine tau humaine normale à la place des protéines APP et tau de la souris. Des résultats préliminaires suggèrent que dans ce nouveau modèle les pathologies amyloïde et tau se développent progressivement avec l'âge et sont associées à une perte importante de neurone dans les régions affectées très tôt dans la MA. La nature des troubles de la mémoire permettra de cibler précisément une ou deux structures cérébrales. Des anomalies seront recherchées notamment à travers une évaluation des niveaux d'activité de ces structures cérébrales au cours du test de mémoire et à travers une analyse détaillée de la morphologie de leurs neurones et du système des neurones cholinergiques qui joue un rôle de compensation très important au début de la MA. Ce projet permettra donc de valider le tout nouveau modèle des souris APP KI x tau KI. Il démontrera également que la présence conjointe de l'APP mutée humaine et de la protéine tau humaine est nécessaire pour obtenir ce profil neuro-pathologique très proche de la MA. Ce profil unique représente un grand progrès par rapport à ceux des anciens modèles de souris et présage de grandes avancées dans la compréhension de la pathologie Alzheimer et dans le développement de nouvelles thérapies.

Ce projet respecte au plus près la règle des 3R :

Remplacer. L'étude des relations entre les troubles de la mémoire et les anomalies du fonctionnement neuronal induits par une pathologie de type Alzheimer nécessite l'utilisation de l'animal vivant. Les modèles in vitro ou computationnels ne permettent pas encore d'évaluer les fonctions de la mémoire à la fois dans leurs aspects physiologiques et comportementaux.

Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au maximum: 12 souris par groupe est l'effectif minimal dans une étude comportementale sur la mémoire et pour l'analyse de l'activité des structures cérébrales afin de satisfaire aux contraintes des analyses statistiques prévues. L'ensemble du projet requiert 192 souris.

Raffiner: Les souris bénéficieront toujours d'éléments d'enrichissement dans leur cage (matériel de construction du nid, un tube refuge et des boulettes de nourriture à manipuler dans la cage) et d'un suivi quotidien de leur état général. Elles seront maintenues en groupe sociaux sauf pour la durée des tests de comportement. Les tests comportementaux sont basés sur le comportement d'exploration spontanée des souris, sans autre contrainte que d'être mis en présence d'objets dans une grande enceinte (tests de reconnaissance), d'être déposée sur une plateforme d'un mètre de diamètre pour trouver un trou menant à leur cage (test de mémoire spatiale) ou déposée dans un dispositif formé d'une boîte sombre connectée à une boîte fortement éclairée (test d'anxiété).

7379 L'adénocarcinome du pancréas humain (PDAC) est l'un des cancers les plus redoutables et meurtriers dans le monde. Il représentait la quatrième cause de décès par cancer au niveau mondial en 2012. En l'absence de progrès dans sa prise en charge, les données actuelles prédisent que le PDAC sera la seconde cause de mortalité par cancer en 2030. Le taux de survie ne dépasse pas 20% à 1 an et 3% à 5 ans avec une moyenne de survie de 3 à 4 mois après le diagnostic. Il fait l'objet d'un diagnostic tardif et présente une évolution très rapide principalement due à la formation de métastases. A ce jour, aucune thérapie efficace du cancer du pancréas exocrine, qui demeure peu sensible à la chimiothérapie et à la radiothérapie, n'est disponible. L'espoir pourrait venir du protocole Folfirinox (chimiothérapie composée de 4 médicaments: oxaliplatine, irinotécan, 5-fluorouracile et acide folinique) qui augmenterait sensiblement le taux de survie des patients. Depuis quelques années, de nouveaux concepts voient le jour, fondés sur la combinaison de plusieurs stratégies telles que la chimiothérapie associée à l'immunothérapie. Dans le modèle murin, la vaccination anti tumorale par les cellules dendritiques (DC) a été montré efficace. L'émergence de ces nouvelles stratégies thérapeutiques permettraient la mise en place à terme de traitements plus efficaces afin d'augmenter les chances de survie des patients.

Objectif du projet: Dans un modèle de souris C57Bl/6J de cancer du pancréas, ce projet consistera tout d'abord à déterminer dans une étude pilote les doses minimales de drogues composant le protocole Folfirinox qui auront (1) peu d'effet sur la qualité de vie et le bien-être animal, (2) et peu d'impact sur les populations de cellules du système immunitaire de la souris. Si cette étude pilote est concluante, le protocole de chimiothérapie sera appliqué dans une 2ème procédure qui consistera à l'associer à un protocole de vaccination anti-tumorale fondée sur l'utilisation de DC pour activer une réponse immunitaire contre la tumeur et permettre ainsi une optimisation des effets thérapeutiques.

Avantages du modèle et dommages attendus pour l'animal: Dans ce projet il sera utilisé un modèle animal de cancer du pancréas qui consistera en une injection de cellules tumorales pancréatiques de souris de la lignée Panc02 dans le pancréas d'une souris C57bl/6J pour développer une tumeur pancréatique. Ce modèle va nous permettre (1) de reproduire les caractéristiques de l'environnement tumoral et immunitaire sous protocole Folfirinox, reflétant ainsi ce qui peut se passer chez les patients et (2) de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans une réponse immunitaire anti-tumorale afin d'optimiser la réponse thérapeutique.

Nombre total d'animaux utilisés: il sera de 110 souris C57bl/6J réparties dans 2 procédures expérimentales.

1. La procédure expérimentale n°1 (ou Etude Pilote) consistera à évaluer la toxicité du protocole Folfirinox et son impact sur les cellules du système immunitaire. Elle sera réalisée sur 14 souris réparties en 5 groupes.

2. La procédure expérimentale n°2 consistera à évaluer l'efficacité thérapeutique d'un protocole associant Folfirinox et immunothérapie contre la tumeur pancréatique. Elle sera réalisée sur 42 souris réparties en 6 groupes de 7 plus 6 donneurs de moelle osseuse et reproduite 2 fois pour obtenir des valeurs statistiques ($48 \times 2 = 96$ souris).

3. Total $14 + 84 + 12 = 110$ souris

Conformité avec les exigences des 3R:

1. Réduction: Dans le souci de réduire la quantité d'animaux, une étude pilote sera réalisée pour nous permettre d'évaluer la pertinence de réaliser la procédure n°2. Pour l'ensemble des 2 procédures le nombre par groupe a été minimisé. Il se justifie par le fait d'avoir assez de matériels cellulaires pour

réaliser les différentes expériences in vitro, gommer les différences inter-individus et obtenir des résultats statistiquement exploitables (utilisation du test non-paramétrique de Mann-Witney).

2. Remplacement: Ce modèle animal ne peut être remplacé car il va nous permettre de déterminer l'efficacité thérapeutique de l'association Folfirinox/immunothérapie par DC et étudier les populations de cellules du système immunitaire suite à ce traitement.

3. Raffinement: Les critères de raffinement suivants seront appliqués:

- Un délai de 7 jours sera respecté entre la réception des animaux et l'implantation de tumeurs, permettant ainsi d'évacuer le stress du transport et de s'adapter au nouveau milieu.
- Les animaux auront accès ad libitum à l'eau et la nourriture jusqu'au jour des interventions.
- Les animaux seront toujours répartis par groupe de 3 ou 4 par cage à laquelle sera ajouté de l'enrichissement (jouet, coton, nids ...).
- Tous les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie générale par sévoflurane, associés à un traitement antalgique pré et post-opératoire.
- Au bout de 5 semaines de développement tumoral et traitement, les euthanasies seront réalisées pour les prélèvements de la rate, des ganglions lymphatiques, du sang, du pancréas et de la tumeur, (les expérimentations réalisées par le passé sur ce modèle ainsi que les données de la bibliographie montrent que la tumeur pancréatique se développe et reste localisée au niveau du pancréas pendant cette période).
- Durant la période de croissance tumorale et de l'application des protocoles thérapeutiques, les signes comportementaux seront surveillés pour éviter tout développement d'une souffrance animale. Une grille d'évaluation de la douleur sera utilisée selon les critères suivants:
- Paramètres physiopathologiques: mesure bi-hebdomadaire du poids de l'animal et de la prolifération tumorale.
- Comportement (observation quotidienne): dynamisme et postures de l'animal (postures générale et faciale, comportement exploratoire).
- Apparence physique externe (observation quotidienne): aspect de la peau (cicatrisation de la plaie chirurgicale suite à la greffe orthotopique, blessure, morsures), et sur un plan général (déshydratation, abdomen creux, troubles urinaires ou défécatoires, consistance et quantité des selles).
- Si un comportement de souffrance est observé, un antalgique sera administré.
- Les euthanasies seront réalisées par dislocation cervicale sous anesthésie générale dans une pièce d'expérimentation isolée des pièces d'hébergements et de ses congénères.

L'autisme est un trouble précoce du développement qui s'accompagne généralement de déficits cognitifs altérant les apprentissages et l'intégration sociale. Si à l'heure actuelle l'autisme ne se guérit pas, différents médicaments peuvent aider à réduire les comportements répétitifs, l'hyperactivité, l'agressivité, les troubles de la mémoire ou du comportement social.

Au sein de notre laboratoire, nous travaillons sur un gène de susceptibilité lié à l'autisme : Shank3. Ce projet vise à caractériser une lignée transgénique présentant une délétion de ce gène (lignée « KO Shank3 »), créée récemment, afin d'identifier la nature exacte des éventuels troubles cognitifs et du comportement social.

Notre projet repose sur l'évaluation du comportement animal faisant appel aux capacités cognitives et sensorielles de l'animal ce qui reste encore impossible à modéliser. A ce jour, les seuls modèles animaux des troubles du spectre autistique sont des modèles murins transgéniques. Par conséquent, nous pensons qu'il n'existe pas de remplacement disponible à notre modèle expérimental qui permettrait d'atteindre les objectifs scientifiques du travail proposé.

Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie, observés quotidiennement et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place. Enfin, pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous utiliserons les mêmes animaux pour les différents tests comportementaux. Nous considérons qu'un nombre minimum de 15

animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale, et nous travaillerons en parallèle sur des animaux mâles et femelles.

Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 498 animaux.

7380 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Ce virus est responsable d'une pandémie touchant 35 millions de personnes et qui continue de s'étendre avec plus de 2 millions de nouvelles infections chaque année. L'incidence de l'infection par le VIH est particulièrement élevée dans les pays en voie de développement et les femmes en sont les premières victimes. Celles-ci vivent une situation dramatique sur le plan de la santé publique. Soumises à des pressions sociales, culturelles et économiques, elles ne contrôlent pas leurs modes de protection ni leur sexualité découvrant leur séropositivité au VIH souvent à l'occasion d'une grossesse.

Une partie des recherches actuelles se concentre sur la mise au point de moyens de prévention combinant des molécules antirétrovirales et un agent contraceptif à longue durée d'action. L'objectif est de pouvoir offrir aux femmes des moyens de prévention pour assurer leur propre protection contre le VIH et prévenir les grossesses non désirées. Un tel moyen de prévention leur permettrait d'améliorer leur santé et d'éviter de nouvelles infections VIH maternelles et/ou pédiatriques.

Le projet présenté ici s'attache à évaluer la pharmacocinétique de formulations injectables à longue durée d'action combinant une molécule antirétrovirale et un progestatif. Les formulations auront été auparavant strictement sélectionnées et validées *in vitro* (mesure de la stabilité des molécules et de leurs interactions dans la formulation). En revanche, à ce stade, aucun dispositif *in vitro* ou *in silico* ne peut reproduire le profil pharmacocinétique chez l'Homme de toutes molécules administrées. Il est nécessaire de recourir aux modèles animaux. Pour ce projet, il s'agit du primate non humain (PNH), modèle le plus pertinent pour corrélérer les paramètres pharmacocinétiques et physiologiques de toutes molécules administrées *in vivo* à ceux qui seront obtenus chez l'Homme. A l'heure actuelle, les PNH constituent le modèle le plus pertinent pour obtenir des résultats de valeur prédictive.

Le projet prévoit au maximum 16 PNH (femelles adultes) 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 permettant une interprétation statistique des résultats. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour limiter au maximum toute souffrance lors des interventions: administration de la formulation injectable, prélèvements de sang, de fluides muqueux, de biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés. En cas d'apparition d'effets inattendus ou points limite prévus dans le projet, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés. Les animaux seront hébergés en groupe et bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la cellule de l'établissement en charge du bien-être animal.

7381 La vision est une fonction particulièrement rythmique, étant donné que l'œil est capable d'adapter son fonctionnement à des variations journalières d'intensité lumineuse particulièrement importantes. Cette adaptation est possible grâce à la présence, dans la rétine, d'une horloge circadienne qui contrôle un grand nombre de processus liés à la perception de la lumière, au traitement de l'information visuelle, au maintien de l'homéostasie de la rétine et plus généralement à sa survie. L'horloge circadienne elle-même est une sorte de pacemaker moléculaire impliquant un petit nombre de protéines "horloge" qui se régulent entre-elles entraînant des oscillations de leur expression et de celle de nombreux gènes cibles.

De nombreuses pathologies générant la perte de vision chez l'Homme ont une origine génétique. Par exemple la rétinopathie pigmentaire, qui touche en premier lieu les photorécepteurs de type bâtonnet, met en jeu des mutations dans des gènes très variés. Il est connu que l'horloge circadienne contrôle l'expression de la moitié des gènes; ceci nous a conduits à proposer qu'une horloge défectueuse pourrait moduler les événements moléculaires liés aux dégénérescences rétiniennes et ainsi influencer le déclenchement, la sévérité ou encore la progression de la maladie. Cette hypothèse est soutenue par l'observation que les rétinopathies pigmentaires se manifestent de façon très diverse, même à l'intérieur d'une même famille. Cette variété de phénotypes pourrait être due à une différence dans la qualité de l'horloge rétinienne chez chaque individu.

Notre projet propose d'évaluer cette hypothèse en analysant chez la souris, les effets combinés de la dégénérescence rétinienne induite génétiquement et d'un dysfonctionnement (induit génétiquement) de l'horloge dans les photorécepteurs. Les effets seront testés grâce à des analyses fonctionnelles (électrorétinographie: permettant d'évaluer l'intégrité fonctionnelle des photorécepteurs) et morphologiques (histologie, immunohistochimie: permettant d'étudier la perte/altération phénotypique, de types cellulaires précis).

Les effets de la combinaison des mutations seront comparés aux effets de chaque mutation prise isolément; mutation RhoP23H pour la dégénérescence des bâtonnets (cinétique modérée) et délétion du gène horloge Bmal1 spécifiquement dans les bâtonnets (ce mutant n'a jamais été généré et on ne connaît pas son phénotype).

Le projet est basé sur l'utilisation de souris génétiquement modifiées car il s'agit du modèle de choix actuellement, pour mesurer l'importance des horloges dans la physiologie, et qui ne peut être remplacé, en ce qui concerne un tissu et une fonction qui sont aussi complexes que la rétine et la vision, par des systèmes in vitro (principe de remplacement). Les animaux chez qui l'électrorétinogramme sera enregistré, seront suivis de façon longitudinale (mesures régulières à différents âges) ce qui permettra de limiter le nombre d'animaux (principe de réduction). Pour cette même raison, lorsque la dégénérescence aura été démontrée par perte de réponse à la lumière, les animaux seront euthanasiés pour analyser l'anatomie rétinienne sur les globes oculaires prélevés. Les électrorétinogrammes seront réalisés sur animaux anesthésiés limitant le stress lié à la procédure sans interférer avec les mesures réalisées (principe de raffinement). Les animaux seront hébergés en cages collectives contenant du matériel de nidation et un bâton à ronger. L'ensemble de ces éléments et les contraintes des analyses statistiques appropriées pour ce genre d'études conduiront à l'utilisation d'un nombre maximal de 188 animaux.

7382 La vaccination constitue la méthode de prévention la plus efficace contre les maladies virales. Différentes approches vaccinales existent et chacune de ces approches présente des limites : difficultés de production et de purification des vaccins à des coûts acceptables, contraintes lourdes des tests d'inactivation, nécessité d'adjuvant, nécessité dans certains cas de disposer de vaccins multivalents contre différentes versions d'un même virus, et besoin de vaccins marqueurs distinguant les animaux vaccinés des animaux infectés. Ce projet propose une nouvelle stratégie de vaccination basée sur la mise au point d'une plateforme vaccinale originale pouvant être produite en grande quantité, à faible coût, fortement immunogène et ne nécessitant pas d'adjuvant, offrant la possibilité de présenter plusieurs antigènes (multivalent), et inactivée naturellement chez les vertébrés supérieurs (incluant l'homme). Cet outil vaccinal repose sur l'utilisation de virus de poisson, le VSHV (virus de la septicémie hémorragique virale) et le VNHI (virus de la nécrose hématopoïétique infectieuse), des rhabdovirus se répliquant à basse température (<14°C), incapables de se multiplier, et donc spontanément inactivés et donc sans risque à plus haute température (>20°C).

L'objectif de ce projet est de tester des virus dérivés du VSHV ou de l'IHNV et de valider leur utilisation comme plateformes vaccinales présentatrices d'antigènes protecteurs contre différents virus tels que des arbovirus (le virus du Nil Occidental (West Nile Virus, WNV), les virus de la dengue (DENV), le virus chikungunya...), des virus respiratoires (les virus Influenza, le virus respiratoire syncytial humain et bovin (HRSV et BRSV)...), des virus entériques (virus de la diarrhée épidémique porcine (PEDV))... ; mais également comme vaccins thérapeutiques contre différents types de cancer (mélanome, cancer du col de l'utérus...). Nous proposons donc de générer des VSHV et VNHI recombinants qui expriment à leur surface des antigènes impliqués dans la réponse de l'hôte vis-à-vis de ces différentes cibles. Pour démontrer l'immunogénicité et la protection induite par ces plateformes, il est donc nécessaire d'utiliser des animaux. Ces expériences seront réalisées sur la souris car ce modèle animal est reconnu par la communauté scientifique pour l'identification de stratégies vaccinales efficaces et transposables à l'homme. Les animaux recevront une dose vaccinale et des prélèvements sanguins seront effectués afin d'évaluer la réponse immunitaire contre les antigènes ciblés. Une infection d'épreuve sera alors réalisée, si et seulement si une réponse immunitaire spécifique est détectée, afin de tester le niveau de protection acquis par les animaux vaccinés. Pour répondre aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, chaque vaccin sera préalablement validé in vitro en culture cellulaire pour la présence de l'antigène d'intérêt avant tout passage à un nombre minimum d'animaux permettant une étude statistique. Les différentes manipulations, comme

l'administration des doses vaccinales ou les prises de sang, seront réalisées sous anesthésie et un suivi quotidien sera effectué afin d'assurer le bien-être des animaux durant toute la durée des expériences. Tout cas de douleur éventuelle sera analysé et l'animal sera euthanasié si les points limites sont atteints. Une expérience type comportera un maximum de 72 animaux pour le test de six conditions. Ce protocole prévoit l'utilisation de 1440 souris sur une période de 5 ans. Les retombées majeures attendues de ce projet sont la démonstration de l'efficacité des rhabdovirus de poissons comme plateforme vaccinale et la production de nouveaux vaccins afin de répondre aux préoccupations du grand public.

7383 La plateforme technologique, développée par un laboratoire pharmaceutique, utilise le globule rouge afin de dispenser les composés thérapeutiques plus efficacement. Les globules rouges sont sensibles aux stress osmotiques capables de dilater ou resceller les pores à la surface de la cellule permettant ainsi au composé d'entrer et d'être piégé dans la cellule. L'encapsulation de la molécule thérapeutique présente de nombreux avantages par rapport à la forme libre du composé. La membrane du globule rouge protège la substance thérapeutique, lui permettant de rester plus longtemps dans l'organisme, ce qui permet de réduire la fréquence d'administration ainsi que la dose elle-même. La membrane de la cellule protège également l'organisme contre la toxicité directe du médicament ce qui induit une réduction de l'incidence des réactions allergiques et des autres effets secondaires. La combinaison de l'efficacité prolongée et de la réduction de la toxicité est particulièrement intéressante dans l'administration de certaines enzymes thérapeutiques, qui ont souvent des durées de demi-vie courtes associées à une toxicité importante, ou encore d'autres enzymes utilisées contre les maladies métaboliques. De plus en modifiant la membrane du globule rouge après l'encapsulation, il devient possible de viser certaines cellules immunitaires dans la rate, le foie, la moelle osseuse avec des applications en immunothérapie. Cette stratégie a déjà été évaluée lors de phase I chez l'Homme, et il est demandé des compléments réglementaires pour les autorisations de mise sur le marché.

Cette étude vise à comparer la distribution de globules rouges non modifiés versus des globules rouges thérapeutiques. La biodistribution sera évaluée par l'utilisation de méthodes radioactives, les plus sensibles à ce jour, associant quand cela est possible l'imagerie médicale afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Ces méthodes sont couramment utilisées chez l'Homme et sont sans danger, à la fois pour l'Homme et pour la souris du fait des très faibles activités utilisées. Ainsi, il sera possible d'évaluer les différences de localisation entre des globules rouges non modifiés et des globules rouges encapsulant ou non un composé. Cette étude permettra d'évaluer également la durée (au maximum 20 jours) de la résidence des différents globules rouges thérapeutiques dans l'organisme. Pour se faire 16 lots de globules rouges seront étudiés sur 2 ans. Un total de 384 souris sera utilisé. En effet, avec des outils d'imagerie scintigraphique adaptés au petit animal, il est possible de réaliser un suivi longitudinal du même animal par la réalisation d'images multiples, de type images médicales en 2 ou 3 dimensions sur 24h, limitant ainsi le nombre de souris utilisées, et évitant des prélèvements. Puis, du fait de l'utilisation d'un isotope de demi-vie plus longue, mais non détectable par imagerie médicale, il sera possible, après euthanasie de l'animal, de mesurer la distribution des globules rouges dans les différents organes d'intérêt à différents temps supérieurs à 24h. Après une période de 9 jours d'acclimatation, les animaux seront injectés par voie intra-veineuse avec les globules rouges modifiés ou non, sous anesthésie gazeuse par isoflurane. L'imagerie scintigraphique (équivalente à une imagerie par scanner à rayons X) sera réalisée à différents temps de mesure, fonction de l'application médicale envisagée, sous anesthésie à l'isoflurane, la souris étant allongée sur un lit chauffant. Au terme de l'acquisition des différentes images (24h maximum), la souris est euthanasiée pour collecter les organes d'intérêt, et ainsi quantifier la concentration de globules rouges radiomarqués par gramme d'organe d'intérêt par rapport à la dose totale injectée. Pour les temps plus longs, jusqu'à 20 jours, le même type de procédure est appliquée, mais avec un isotope de demi-vie plus longue (^{51}Cr) et sans imagerie scintigraphique, car la détection n'est pas envisageable avec ce traceur. Les deux traceurs ($^{99\text{m}}\text{Tc}$ et ^{51}Cr) utilisés sont ceux qui permettent une excellente fixation à l'hémoglobine, comme cela a été démontré pour leur utilisation en clinique humaine. Les organes prélevés seront comptés dans un compteur gamma adapté. Toutes les souris utilisées seront étudiées au maximum 20 jours. Ces méthodes isotopiques n'entraînent aucun dommage aux souris, ni souffrance, les globules rouges modifiés restent des globules rouges, et la radioactivité est à dose très réduite sans aucun impact sur la durée de l'étude. Néanmoins les points limites, répertoriés dans le tableau joint en annexe de la demande, et mis en place dans le cadre du suivi du bien-être animal

de notre structure, seront appliqués en cas de trouble clinique. En fonction des points de surveillance (état général, température, poids, prise d'aliment et de boisson, déplacement, poils, toilettage) et en particulier diarrhée et amaigrissement, une analgésie pourra être pratiquée selon le protocole décrit. A noter aussi qu'un enrichissement systématique du milieu d'hébergement est réalisé avec des roues, des boules et des carrés de coton.

Il n'existe pas de méthode alternative actuellement dans ce contexte. Fort de notre expertise en exploration fonctionnelle des petits animaux de laboratoire, associée à celle dans les études d'imagerie en clinique humaine, l'ensemble des procédures et mesures seront réalisées dans les conditions les plus adaptées pour limiter le stress et la souffrance animale, et afin de réaliser une analyse pertinente des informations permettant l'obtention de conclusions pour la poursuite ou non du développement des différents globules rouges thérapeutiques. Afin de limiter encore plus l'utilisation d'animaux, les conditions de marquage et leur validité sur les globules rouges murins seront préalablement validées in-vitro limitant la réalisation d'études in-vivo invalides. Ces données associées à la preuve de l'efficacité thérapeutique sont nécessaires pour obtenir l'AMM. Il s'agit donc d'étude entrant dans le cadre de la constitution d'un dossier réglementaire mais pas d'une étude de toxicologie réglementaire nécessitant la réalisation des tests sur les 2 sexes.

7384 Le cortex cérébral est le siège des fonctions cognitives supérieures des mammifères. Le but de notre étude est de comprendre les mécanismes contrôlant la formation des réseaux de neurones dans le cortex au cours du développement embryonnaire, et permettra une meilleure compréhension de perturbations à l'origine de maladies neuro-développementales telles que les troubles de l'autisme, l'épilepsie ou certaines formes de retard mental.

Notre étude portera sur l'étude de deux gènes contrôlant le développement des axones au cours du développement du cortex chez l'embryon. Sur la base de résultats précédents, nous développerons un projet de recherche qui testera comment ces deux gènes interviennent dans l'utilisation du glucose par les neurones. Afin de tester l'importance de cette fonction sur le développement du cerveau chez l'embryon, nous utiliserons des méthodes génétiques largement utilisées chez la souris telles que l'inactivation de ces gènes par knockout, l'expression de molécules fluorescentes et des analyses histologiques.

Notre étude sera conduite chez la souris, car l'architecture du cortex de la souris est proche de l'architecture du cortex humain, et des tests standardisés de comportement permettent de modéliser les fonctions cognitives telles que la mémoire ou le comportement social et qui sont perturbées dans les maladies neuro-développementales.

Notre projet est divisé en 4 procédures et se déroulera sur 5 ans. Nous estimons que notre projet mobilisera sur cette période un total de 3432 souris, comprenant les animaux reproducteurs permettant le maintien de la colonie de souris. Le recours à un modèle animal est une nécessité car les différentes étapes du développement des neurones dépendent de l'architecture tissulaire du cerveau. Néanmoins à chaque fois que cela sera possible, nous opterons pour des approches in vitro afin de remplacer les animaux par des lignées cellulaires. Par ailleurs, nous mettrons en œuvre des stratégies pour réduire le nombre d'animaux nécessaires, telles que l'analyse statistique au préalable à toute expérimentation (tests de puissance), ou la réalisation de plusieurs tests en parallèles à partir des mêmes échantillons prélevés. Enfin, nous chercherons à raffiner nos protocoles, notamment par l'enrichissement de l'environnement des animaux et le recours systématique aux techniques d'analgésie et d'anesthésie pour toute manipulation susceptible d'entraîner du stress ou de la douleur chez l'animal.

L'hormone mélatonine est le principal produit de sécrétion de la glande pinéale et joue un rôle majeur dans le contrôle de la physiologie saisonnière et des rythmes circadiens. Elle est produite à partir de la sérotonine de manière hautement rythmique (elle est sécrétée strictement pendant l'obscurité) et agit donc comme un message hormonal de la longueur du jour, ou photopériode. En conséquence, elle joue un rôle critique dans le contrôle des fonctions neuroendocrines saisonnières telles que la reproduction en agissant dans des noyaux hypothalamiques et la pars tuberalis de l'hypophyse. En tant que sortie principale de l'horloge centrale (noyaux suprachiasmatiques ou SCN), la mélatonine est un signal rythmique important distribué dans tout le corps via la circulation générale, et peut agir de manière chronobiotique sur le système circadien. Deux récepteurs membranaires à haute affinité

pour la mélatonine ont été caractérisés : MT1 et MT2. Le présent projet a pour but d'utiliser un outil génétique pour poser la question des sites d'expression des gènes codant les récepteur MT1 et MT2 chez la souris. Pour cela, nous avons généré une souris transgénique dans laquelle le gène de la recombinaison CRE (inductible) a été inséré dans le locus codant MT1 (Mtnr1a). Grâce au croisement de cette souris avec une souris contenant un marqueur fluorescent dont l'expression dépend de la recombinaison, nous pourrions visualiser l'expression des gènes codant MT1 et MT2 par visualisation de la fluorescence sur coupes.

La cartographie des récepteurs MT1 et MT2 a été étudiée essentiellement par hybridation *in situ* mais de telles études ont été entravées par le faible niveau d'expression des ARNm de ces gènes. Par ailleurs, l'absence d'outils anticorps ou pharmacologiques spécifiques fait qu'on ne peut pas, actuellement, donner un patron d'expression fiable pour ces récepteurs. C'est pourquoi nous pensons qu'un outil génétique (donc hautement spécifique) couplé à un système d'amplification (l'utilisation indirecte de la fluorescence) devrait permettre de contourner ces problèmes et répondre à la question posée. Par définition l'investigation d'une telle question scientifique requiert l'utilisation d'animaux (principe de remplacement) mais le nombre en sera très limité (principe de réduction) car il s'agit d'une étude descriptive. La principale caractéristique de MT1 et MT2 à prendre en compte est le fait que leur patron d'expression évolue fortement au cours du développement embryonnaire jusqu'à la vie post natale ; c'est pourquoi nous avons recours à une stratégie d'induction de la CRE, (injection de tamoxifène) que nous pourrions réaliser à l'âge adulte, de sorte à cibler spécifiquement le patron d'expression à cet âge-là. C'est le raffinement maximal que nous pouvons envisager pour répondre précisément et spécifiquement à la question posée.

Les animaux seront hébergés en cages collectives contenant du matériel de nidation et un bâton à ronger.

Le nombre total d'animaux qui seront utilisés est de 120 souris

7385 L'inhibition de l'enzyme 4-Hydroxyphenylpyruvate dioxygénase (HPPD) par des produits appelés HPPDase Inhibitor (HPPDi) est utilisée comme herbicide et comme traitement chez l'homme dans le cas de Tyrosinémies qui sont des maladies génétiques résultant d'un blocage du catabolisme de la tyrosine. Chez les plantes, les HPPDi bloquent la synthèse de la chlorophylle à partir de la tyrosine. Chez l'homme, le traitement par un HPPDi permet de prévenir l'action toxique de certains des catabolites de la tyrosine.

Les études chez le rat, avec cette classe de molécule chimique, ont montré dans certains cas, des effets notamment au niveau des yeux, et dans une moindre mesure de la thyroïde et du pancréas, et ce de façon dose dépendante. Ces observations sont toujours corrélées à une augmentation du niveau plasmatique en tyrosine.

L'objectif de ce projet est de déterminer le Mode d'Action des effets induits par le blocage de la HPPD. Notamment il est important de comprendre et de déterminer si la toxicité observée chez le rat après traitement par les HPPDi est due à un effet direct de la molécule au niveau des organes cibles, ou bien résulte seulement (ou en partie) de l'accumulation de tyrosine dans l'organisme.

Si des modélisations mathématiques par ordinateurs (études *in silico*) et des modèles cellulaires (tests *in vitro*, par exemple des cultures de cellules hépatiques, de la thyroïde et du pancréas) sont développés pour étudier ce Mode d'Action et en évaluer la pertinence pour l'homme, ce projet comprend une série de modèles animaux (études *in vivo*) pour confirmer les hypothèses en augmentant ou diminuant le niveau de Tyrosinémie. Des études, à court terme et jusqu'à 90 jours, seront entreprises dans le but de moduler le niveau plasmatique en tyrosine, à l'aide ou non de HPPDi. Des comparaisons entre rat et souris seront réalisées afin de comprendre la différence de sensibilité entre ces deux espèces, dans le but *in fine*, d'extrapoler sa pertinence à l'homme.

Toutes ces études se font dans le respect des 3Rs avec un nombre restreint d'animaux. Un total estimé de 1000 rongeurs pourra être utilisés sur 3 années pour ce projet. Les animaux seront hébergés par groupe ou individuellement si nécessaire avec un enrichissement du milieu adapté à leur âge et à leur espèce. Les animaux sont observés tous les jours (week-ends compris). Des points limites ont été définis par le laboratoire, conditionnant l'appel à un vétérinaire du site. A la fin de

chaque étude, une évaluation rétrospective sur le bien-être animal est réalisée par la structure du bien-être animal et le comité d'éthique.

7386 Objectifs

Le projet a pour objectif de former le personnel, de valider des méthodes d'hébergement ou de manipulation des animaux pour les espèces suivantes : cobaye, hamster, lapin, rat, souris, canard, bovin, caprin, chat, chien, dinde, gerbille, ovin, porc, poulet.

Dommages/avantages :

Les animaux peuvent présenter une légère augmentation de stress due aux actes techniques et aux manipulations.

L'objectif étant de former du personnel compétent pour utiliser les modèles animaux à des fins scientifiques et afin de garantir une commercialisation de vaccins et ou de produits pharmaceutiques efficaces et sûrs qui protègent l'animal contre les maladies.

Informations sur les espèces utilisées

300 cobayes, 1500 hamsters, 125 lapins, 200 rats, 2000 souris, 100 canards, 50 bovins, 50 caprins, 100 chats, 50 chiens, 100 dindes, 50 gerbilles, 50 ovins, 50 porcs et 250 poulets sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Autant que faire se peut, la formation du personnel est assurée par du tutorat lors de procédures expérimentales ou sur des modèles n'utilisant pas l'animal (silicone, informatique, tissus...). Néanmoins, il est parfois indispensable d'avoir recours à des animaux lorsque cet objectif ne peut être atteint par d'autres approches. De plus, pour la validation des méthodes d'hébergement, l'animal ne peut être remplacé.

Réduction : Il n'y a pas de justification à augmenter les effectifs d'animaux pour la formation, le nombre sera donc réduit au plus juste. Les animaux utilisés sont ceux déjà sur place.

Raffinement : L'utilisation d'animaux pour des formations spécifiques ne sont mises en œuvre que lorsque la formation souhaitée ne peut être acquise autrement. La période de formation est toujours supervisée par un tuteur.

Les animaux utilisés pour la formation sont si nécessaires anesthésiés pour les manipulations. Pour la validation des méthodes d'hébergement aucun acte technique n'est réalisé sur les animaux.

Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort.

Tous les animaux utilisés pour la formation et la validation des hébergements sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés du milieu ont été mis en place dans les hébergements. La Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

7387 Les chevaux sont régulièrement utilisés dans la recherche pre-clinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible). Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale,) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible). Dans ce type d'étude, un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et/ou enzymatiques (sang/urine), des potentielles modifications macroscopiques et microscopiques des tissus et organes et/ou suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) est également possible. Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier. Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales: la procédure d'administration du produit à tester, la procédure de prélèvements sanguins répétés. De plus, des prélèvements d'urine, de différents tissus ou organes seront parfois nécessaire. Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires. Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés majoritairement par groupe ou de

façon individuelle que si nécessaire. L'hébergement des animaux est conforme à la directive en vigueur et conforme au programme d'enrichissement du milieu. Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique...).

Il est prévu d'utiliser 500 animaux dans ce projet sur 5 ans.

Les éleveurs de bovins sont amenés à soigner des animaux malades ou à utiliser des médicaments de manière préventive.

Pour les vaches laitières, des textes officiels encadrent des études qui permettent de s'assurer de l'absence de résidus de ces produits dans le lait destiné à la consommation humaine. Ces études permettent de fixer le temps pendant lequel le lait doit être jeté et non consommé suite à l'administration d'un médicament vétérinaire. La procédure consiste à l'administration du médicament dans les conditions normales d'utilisation. Elle est suivie par des prélèvements de lait et par l'analyse du (des) produits dans ces échantillons. Une courbe d'élimination peut ainsi être tracée et permet de définir la date à laquelle les limites maximales acceptables de résidus sont atteintes. Avant et possiblement après l'administration, des prises de sang seront réalisées afin de suivre l'état de santé général de l'animal. L'hébergement s'effectue dans les conditions normales d'hébergement de ces animaux chez un éleveur ou dans nos hébergements.

Le but du projet est de tester 20 formulations ; ces études sont généralement menées sur des groupes de 20 vaches laitières par formulation (soit un total de 400 animaux) sur 5 ans. Deux études par an sont programmées en moyenne, soit un total de 80 animaux utilisés par an.

7388 Dans le cadre de la fabrication de médicaments contenant de l'insuline à action prolongée pour le marché russe, un test d'activité du produit doit être réalisé sur lapins. Cet essai permet de vérifier l'activité hypoglycémique du médicament après son injection à un groupe de lapins, en comparaison avec une solution d'insuline de référence injectée à un groupe témoin de lapins. La glycémie est ensuite mesurée dans différents échantillons de sérum prélevés à différents temps après l'injection.

Lors des essais, les animaux seront maintenus en groupes sociaux selon la réglementation et de l'enrichissement leur sera fourni. Une observation journalière des animaux est réalisée depuis leur réception jusqu'à la fin de l'étude afin de garantir leur bien-être tout au long de l'étude.

La quantité d'animaux utilisés est estimée à 216 lapins par an, soit 1080 lapins pour la durée du projet.

Cet essai est aujourd'hui demandé par les autorités russes pour valider l'action prolongée des médicaments à base d'insuline. Dans les autres pays où sont distribués ces produits, l'action prolongée est vérifiée par une méthode *in vitro* (forme des cristaux d'insuline), mais cette méthode *in vitro* n'est à ce jour pas validée par les autorités russes.

7389 L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité de composés chimiques ou biologiques sur des maladies dermatologiques induites ou non chez la souris et le rat, exceptionnellement chez la gerbille.

Plusieurs types de maladies dermatologiques pourront être étudiées via des modèles spécifiques. Ces maladies dermatologiques pourront être induites soit par des traitements topiques avec des molécules chimiques (psoriasis et eczéma), soit par des injections répétées de cytokines (psoriasis), soit par administration intradermique d'un agent chimique ou biologique (démangeaison/prurit). La production de sébum, une composante de l'acné, pourra être étudiée sur des animaux sains sans induction spécifique de la pathologie.

Le psoriasis est une maladie très répandue caractérisée par de grandes plaques squameuses sur la peau, dont la taille peut atteindre plusieurs centimètres. Bien que le psoriasis ne soit pas une maladie dangereuse au point d'engager le pronostic vital, elle est néanmoins source de souffrance considérable pour les patients et altère fortement leur qualité de vie. C'est une maladie multifactorielle dont le mécanisme exact n'est pas encore élucidé. Les lésions psoriasiques peuvent être induites chez le rongeur sur la peau du dos préalablement rasée par l'application topique journalière durant 10 à 15 jours d'une crème contenant 5% d'Imiquimod, ou par injection intradermique quotidienne d'agents inflammatoires. L'imiquimod est un médicament immuno-stimulant utilisé dans le traitement

des cancers de la peau et des verrues chez l'homme, dont l'un des effets secondaires est de créer des lésions inflammatoires de type psoriasique. Les effets attendus sur les animaux sont modérés, avec apparition de plaques rouges (érythème) sur la peau traitée et une perte de poids. Tout autre signe clinique non attendu constituera un point limite dans ce modèle.

L'efficacité des composés sur le psoriasis sera déterminée visuellement en établissant un score clinique (intensité de l'érythème, nombre de plaques, aspect des lésions), et en mesurant l'épaississement de l'épiderme par analyse histologique ainsi que l'expression de différents gènes dans la zone de peau traitée.

L'eczéma ou dermatite atopique correspond à des manifestations inflammatoires cutanées récidivantes (rougeurs et dessèchement cutané) qui apparaissent dans le cadre d'une prédisposition génétique à présenter des réactions excessives aux allergènes (excès de production des immunoglobulines E). Le nombre de patients atteints dans la population générale a triplé en 30 ans dans les pays industrialisés et c'est la dermatose la plus fréquente qui peut commencer dès l'enfance (20% d'enfants de moins de 7 ans sont atteints en France). Cette inflammation chronique de la peau se manifeste de façon transitoire avec alternance de période calmes suivies de rechutes, et toujours selon le même processus : érythème puis suintement et enfin croûtes voire œdème avec des épisodes de démangeaison.

Par une exposition répétée à un allergène administré par voie topique, des plaques d'eczéma peuvent être créées chez la souris, accompagnées d'épisodes de démangeaisons et grattements comme observés chez le patient. Par injection intradermique de composés chimiques ou biologiques déclenchant des démangeaisons chez la souris et la gerbille (histamine, substance P, chloroquine etc...), il sera possible de tester de nouvelles molécules visant à calmer les démangeaisons et limiter l'aggravation des lésions engendrées par des cycles répétés de démangeaisons/grattements qui favorisent l'inflammation. Dans ces deux cas, les signes cliniques attendus sont modérés (rougeur, irritation/démangeaisons transitoires). La survenue d'un signe clinique anormal fera l'objet d'une surveillance vétérinaire et pour éviter toute souffrance de l'animal, des points limites ont été définis pour chaque modèle. Les personnes en charge du bien-être et du soin des animaux veillent au respect de ces points limites. L'efficacité des composés sur la dermatite atopique sera déterminée sur plusieurs paramètres comme le prurit, mesuré par le nombre de grattements et leur durée sur une période de deux heures, grâce à un système d'enregistrement vidéo, par analyse histologique de la peau où un épaississement du derme et l'infiltration des cellules inflammatoires sont visibles, et par l'expression de gènes dans la zone de peau traitée.

L'acné est une affection cutanée touchant principalement les adolescents, mais également les nourrissons, les femmes enceintes et certains adultes. C'est une affection de la peau non contagieuse due à l'augmentation de la sécrétion de sébum par les glandes sébacées associée à des phénomènes inflammatoires. L'hyperproduction de sébum est responsable de la formation de points noirs ou comédons. Chez le rongeur sain, le produit à évaluer sera administré en topique 1 ou 2 fois par jour durant 4 semaines sur une portion de peau préalablement tondu. Les signes cliniques attendus dans ce modèle sont légers, puisque seuls des animaux sains sont utilisés sans aucune induction d'une pathologie. L'efficacité des composés sera quantifiée par analyse histologique en mesurant le degré d'atrophie des glandes sébacées dans la zone de peau traitée.

Les différentes procédures de ce projet permettront d'évaluer l'efficacité thérapeutique de composés chimiques ou biologiques qui auront été présélectionnés in vitro sur des critères de puissance et d'efficacité. Ces différentes procédures ne peuvent pas être remplacées par des études in vitro, car il faut avoir tous les acteurs présents au niveau de la peau (cellules immunitaires, glandes sébacées, vaisseaux pour favoriser le recrutement des cellules inflammatoires). L'utilisation de peau reconstituée in vitro ne constitue donc pas une alternative à ce projet. Les administrations de composés chimiques ou biologiques seront réalisées dans un but préventif ou curatif en application topique ou par toute autre voie telle que par exemple sous-cutanée, orale ou intrapéritonéale.

Une analyse statistique des données générées dans ces modèles rongeurs nous permettra de réduire au minimum le nombre d'animaux à inclure dans les études pour obtenir un effet significatif de 50% sur le paramètre d'intérêt dans chaque modèle.

Pour une période de 5 ans, on peut estimer une utilisation de 2000 rongeurs/an soit au maximum 10000 animaux au total pour ce projet.

7390 L'infarctus du myocarde (mort d'une partie ou de la totalité du muscle cardiaque) est un accident lié à une ischémie (diminution de l'apport sanguin artériel) des vaisseaux irrigant le muscle cardiaque. Il peut être à l'origine d'une défaillance de la fonction cardiaque, appelée insuffisance cardiaque. Selon des données OMS, les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité chez l'homme et parmi celles-ci, les cardiopathies ischémiques sont la première cause de décès. Le traitement actuellement le plus utilisé de l'insuffisance cardiaque chez l'homme consiste à associer différents médicaments. Afin de valider l'efficacité de ces médicaments ainsi que de nouveaux traitements innovants et avant de les tester chez l'homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle animal pertinent, compte-tenu des nombreux et complexes mécanismes de régulation de la fonction cardiaque qui nécessitent d'observer les effets du traitement sur un organisme entier. Le modèle d'insuffisance cardiaque créé par ischémie temporaire chez le primate non-humain (PNH) est pertinent car il présente d'excellentes similarités avec les mécanismes de cette maladie chez l'homme.

En outre, chez certains patients souffrant d'insuffisance cardiaque, malgré le traitement peut apparaître une décompensation de l'insuffisance cardiaque, critique car potentiellement invalidante voire mortelle. Il est possible d'étudier cette décompensation par un arrêt du traitement administré sur ce même modèle animal.

L'objectif de ce projet est donc double, puisqu'il consiste en 2 procédures exploratoires d'un modèle PNH d'insuffisance cardiaque précédemment autorisé par les autorités réglementaires.

L'objectif de la procédure 1 est l'évaluation de l'efficacité d'un traitement de référence de l'insuffisance cardiaque, utilisé en clinique chez l'homme. Pour cela, un modèle d'insuffisance cardiaque induit par ischémie myocardique sera mis en œuvre sur des singes cynomolgus. Il sera effectué par voie endovasculaire, pour une invasivité et une douleur postopératoire minimales, sous anesthésie générale volatile et analgésie préventive. Les animaux seront répartis de façon aléatoire dans 2 groupes : un groupe recevant le traitement à évaluer, l'autre groupe recevant le véhicule du traitement, par voie orale quotidienne pendant 4 semaines.

Par souci de réduction, les mêmes animaux seront également mis à profit, dans la procédure 2 du projet, pour déterminer l'effet de l'arrêt du traitement sur la fonction cardiaque. L'arrêt du traitement devrait provoquer une décompensation de l'insuffisance cardiaque, mimant l'aggravation des symptômes et signes apparaissant chez certains patients souffrant d'insuffisance cardiaque chronique. Si l'arrêt du traitement n'engendre pas la décompensation attendue entre la 5^e et la 8^e semaine de suivi, la décompensation cardiaque sera induite. Les animaux seront euthanasiés au plus tard à la 9^e semaine, pour prélèvement d'organes en vue d'analyses microscopiques.

Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

Tout au long du projet, des évaluations cliniques, fonctionnelles et morphologiques de la fonction cardiaque seront menées régulièrement, au moyen de techniques non-invasives (mesures de pression artérielle, ECG, échocardiographie, IRM), par des vétérinaires et des experts. Des marqueurs de l'inflammation, de l'ischémie myocardique et de la fonction rénale seront également évalués grâce à des prises de sang, dans les limites des recommandations de volume hebdomadaire prélevable, afin de déterminer l'effet du traitement puis de son arrêt et de caractériser ce modèle translationnel d'insuffisance cardiaque.

Les animaux seront suivis individuellement et très régulièrement tout au long du projet, afin de détecter tout signe clinique anormal et tout signe de douleur et/ou de détresse : observation clinique biquotidienne, évaluation du stress et de la douleur quotidienne, pesée hebdomadaire. 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 sortir l'animal de l'étude si des effets attendus ou inattendus apparaissent. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

Réduction :

Ce projet prévoit au maximum 100 animaux sur 5 ans. Ce nombre a été réduit au minimum pour évaluer l'efficacité de différents traitements innovants de l'insuffisance cardiaque et obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme.

Par souci de réduction, les mêmes animaux inclus dans la procédure 1 seront également mis à profit dans la procédure 2 du projet.

Raffinement :

Les conditions d'hébergement sont conformes à la législation en vigueur et aux recommandations les plus strictes, pour éviter tout stress des animaux. Les animaux seront hébergés par groupes sociaux lorsque possible, et bénéficieront d'un programme d'enrichissement, notamment la mise à disposition et le renouvellement hebdomadaire de jouets dans les hébergements (kong, ballon, tube PVC...), ainsi que la distribution de friandises.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter tout stress ou souffrance lors des interventions sur les animaux. Le personnel au contact des animaux est formé et sous la responsabilité du vétérinaire. Il veillera à garder une interaction quotidienne avec chaque animal afin de diminuer le stress qui pourrait être engendré par les manipulations. Des entraînements réguliers et progressifs des animaux seront effectués dans la même optique. L'intervention pour la création du modèle sera effectuée par la voie la moins invasive et douloureuse possible (voie endovasculaire) par un cardiologue interventionnel expérimenté.

Des points limites précis sont définis pour éviter toute souffrance des animaux et des mesures de réanimation péri-occlusion et lors de décompensation cardiaque sont définies.

7391 Le système immunitaire joue un rôle central dans le développement de pathologies inflammatoires et cancéreuses. Nous allons étudier le système immunitaire de nos souris, dans lesquelles nous allons induire deux modèles d'étude : 1- une inflammation créée par le psoriasis au niveau des oreilles et 2- un cancer par injection de cellules tumorales de mélanome.

L'objectif de nos recherches est de comprendre comment la protéine que nous étudions et dont nous connaissons l'impact important dans ces processus biologiques (prouvé par des expériences in vitro sur ces cellules en culture) peut influencer l'ensemble des réponses immunitaires mises en jeu in vivo dans l'organisme entier et influencer le développement de ces maladies inflammatoires et cancéreuses.

Dans une première série d'expériences, nous induirons un psoriasis sur des groupes de souris possédant ou pas notre protéine d'intérêt, suite à l'application d'une crème induisant une inflammation sur les oreilles. Nous analyserons une semaine après le système immunitaire, plus précisément les lymphocytes T, afin de déterminer l'efficacité de la réponse immunitaire mise en jeu et l'impact de notre protéine sur ces processus in vivo.

Dans une deuxième série d'expériences, nous étudierons le rôle de notre protéine dans la progression tumorale. Nous injecterons des cellules tumorales de mélanome dans nos souris possédant ou pas notre protéine. Nous analyserons l'apparition de métastases pulmonaires et les réponses immunitaires associées afin de déterminer si le développement tumoral est freiné par l'absence de notre protéine.

Pour réaliser ce projet, nous avons réparti les expériences en 4 procédures expérimentales détaillées. Nous serons extrêmement attentifs à ce que notre démarche expérimentale soit en conformité avec les exigences de (1) remplacement, (2) réduction et (3) raffinement.

(1) Remplacement : Les souris constituent un modèle de choix de par le fait qu'elles peuvent être modifiées génétiquement afin d'éliminer la protéine d'intérêt dans un type spécifique de cellules, comme les cellules T ici, et d'étudier leur rôle in vivo. Elles permettent l'étude de mécanismes moléculaires sous-jacents au développement de pathologies dans un environnement complexe, multifactoriel et très proche de l'homme. Dans l'état actuel de notre projet, elles ne peuvent pas être remplacées par un animal plus petit ou des expériences in vitro que nous avons déjà réalisées.

(2) Réduction : Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement réfléchis afin d'utiliser le moins d'animaux possibles, tout en permettant l'obtention de résultats statistiquement satisfaisants. Au cours de notre expérimentation, nous nous réservons, cependant, la possibilité

d'employer des méthodes alternatives et des modèles in vitro, dès que cela est possible, afin de limiter au maximum l'utilisation d'animaux. Ainsi un maximum de 420 souris sera utilisé lors de ce projet.

(3) Raffinement : Nous veillerons consciencieusement au bien-être des animaux en réduisant au maximum la souffrance des souris grâce à un suivi quotidien en s'assurant de ne jamais atteindre un point limite et en utilisant les animaux avant apparition d'un phénotype dommageable.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes qui contrôlent les réponses immunitaires impliquant les cellules T dans un contexte pathologique inflammatoire et cancéreux. Cela permettra d'établir de nouvelles bases moléculaires dans l'élaboration de stratégies thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires et des cancers.

7392 En France et dans le monde, l'incidence du cancer du pancréas et particulièrement l'adénocarcinome pancréatique est en augmentation. En 2012, l'incidence annuelle du cancer du pancréas était d'environ 12000 nouveaux cas. Le pronostic du cancer du pancréas est extrêmement péjoratif avec une survie globale à 5 ans inférieure à 5% tout stade confondu. Un tiers des patients présentent un cancer du pancréas localement avancé (CPLA), c'est-à-dire un cancer non opérable mais sans métastases. Une des options thérapeutiques prescrite pour les CPLA est une chimiothérapie associée à une radiothérapie standard (photon). Compte tenu de la présence de tissu sains entourant la tumeur, les effets secondaires de la radiothérapie standard sont relativement élevés, ce qui nécessite de limiter les doses d'irradiation délivrées.

Contrairement à la radiothérapie standard, la protonthérapie permet de délivrer la dose voulue à la tumeur tout en préservant les organes avoisinants. Les organes à proximité ne sont donc pas irradiés et le risque de complications est largement réduit. Par ailleurs, l'efficacité des protons est de 10% supérieure à celle des photons pour une même dose d'irradiation.

Le but du projet est de valider l'optimisation d'une chimiothérapie associée à une radiothérapie proton sur des tumeurs pancréatiques. L'étude sera réalisée sur des modèles de souris xénotransplantées avec 2 types de lignées cellulaires tumorales pancréatiques humaines. Ces deux lignées cellulaires ont montré de bons résultats in vitro, mais avec des profils différents, d'où l'intérêt de les tester les deux lignées cellulaires.

Une fois les tumeurs établies au niveau du flanc de l'animal, elles seront traitées par irradiation et chimiothérapie afin de mimer le traitement administré aux patients. L'objectif est d'étudier, grâce à ces modèles, des différences d'effet des traitements en vue de valider les résultats obtenus in vitro.

Les tumeurs finales obtenues sur souris ne dépasseront pas le volume limite de 2000 mm³. Le protocole d'irradiation sera mis au point de manière à protéger les souris au maximum et les irradiations seront administrées de manière ciblées.

Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique et dans le respect du principe de réduction, nous utiliserons, pour chaque lignées cellulaire xénotransplantée, 130 souris (13 lots de 10 souris). Au final, pour l'étude in vivo réalisée sur deux lignées cellulaires pancréatiques, nous utiliserons un total de 260 animaux.

En conformité avec la règle des 3R, le bien-être des souris sera suivi régulièrement. Les souris seront anesthésiées dès que des procédures douloureuses et/ou stressantes (implantation de tumeurs, injection des traitements et séances d'irradiation). Les souris et la croissance des tumeurs seront mesurés et évalués trois fois par semaine à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc) et pris en charge selon le score obtenu (traitement contre la douleur si nécessaire), avec euthanasie dès lors qu'un point limite sera atteint (Raffinement). Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur avec des conditions d'hébergement et d'enrichissement de leur environnement conformes à la validation de la cellule bien-être.

Enfin, seule cette étude in vivo permettra de valider les résultats obtenus précédemment in vitro.

7393 Les médicaments, les produits biologiques ainsi que les dispositifs médicaux permettent d'améliorer l'état de santé des patients. Or, par nature, ils sont destinés à être mis en contact avec le corps

humain. Ce contact avec l'organisme pouvant être prolongé dans le temps (par exemple, lors de l'implantation d'un dispositif médical), des réactions cliniques indésirables liées à une toxicité systémique ou locale sont susceptibles de se manifester.

Il est donc impératif, comme l'exige la réglementation (ex : directive 2007/47/CE, 21 CFR 820...), d'identifier ces risques potentiels avant de mettre un produit sur le marché et l'utilisation d'animaux est à ce jour inévitable pour y parvenir. En effet, les méthodes alternatives existantes ne permettent pas d'évaluer les effets toxiques à moyen ou long terme des produits de santé en raison de la complexité des mécanismes de régulation d'un organisme vivant.

Des modèles animaux sont donc définis dans les réglementations et normes en vigueur pour chaque type d'essai réglementaire à mener (norme ISO 10993, lignes directrices...) : il s'agit dans ce projet de rongeurs (rats) ou de non-rongeurs (lapins). Le nombre minimal d'animaux à utiliser est défini dans les textes de référence. Dans le cadre de ce projet, il pourra être utilisé jusqu'à 6500 rats et 550 lapins en 5 ans.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin de lui assurer un bien-être optimal tout au long de l'essai. Lorsque les interventions sont susceptibles d'endolorir l'animal, des mesures sont envisagées (par exemple, anesthésie et analgésie des animaux au préalable).

La structure et la disposition des cages permettent de maintenir des contacts auditifs, olfactifs voire visuels (utilisation de cages transparentes dès que possible) entre congénères. En règle générale, les rats sont hébergés en groupe (2 à 5 rats par cage adaptée) après 4 semaines d'étude et un bedding (sciure) épais est disposé au fond des cages pour permettre un comportement de fouissement. Pour les lapins, des chaînettes seront suspendues aux cages afin qu'ils puissent se divertir et des plateformes seront disposées pour qu'ils puissent s'isoler lorsqu'ils le souhaitent. Enfin, de la musique est diffusée dans toutes les salles d'hébergement pour apaiser les animaux.

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

L'hyperthermie est qualifiée par certains oncologues comme étant le quatrième pilier de l'oncologie avec la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie. L'induction de l'hyperthermie, particulièrement en association avec d'autres modalités de traitement tel que la radiothérapie, permet d'augmenter significativement les taux de survie de patients atteints d'un cancer.

L'hyperthermie peut être induite de manière locale au niveau de la tumeur ou peut-être globale au niveau de l'organisme traité. Des études menées en tubes à essais indiquent que des cellules tumorales exposées à l'hyperthermie, avec une durée optimale de 24H, sont moins résistantes que des cellules normales (elles meurent plus rapidement). Par ailleurs, l'hyperthermie va augmenter la perfusion des tumeurs et par conséquent l'apport en oxygène ce qui va favoriser l'efficacité d'autres traitements tels que la radiothérapie ou les chimiothérapies en favorisant l'adsorption de ces médicaments. Enfin, l'hyperthermie est également connue pour activer le système immunitaire créant ainsi potentiellement des effets cumulatifs avec les effets propres de l'hyperthermie ou les autres modalités de traitements associées. Du fait des interactions de l'hyperthermie avec de nombreux aspects physiologiques ainsi qu'avec le système immunitaire, le recours à un animal vivant s'impose.

Le but de ce projet est donc de développer des méthodes d'induction longue (jusqu'à 24h) d'hyperthermie globale sur des souris anesthésiées porteuses de tumeurs afin de réaliser des essais dans ce modèle animale d'activité anti-tumoral de l'hyperthermie seule ou en combinaison avec des traitements anti-tumoraux de chimiothérapies et radiothérapie.

Dans une première partie du projet, les conditions expérimentales permettant d'obtenir une anesthésie longue des animaux dans des conditions physiologiques normales de température, avec un maximum de 24h, seront évaluées. Cela se fera progressivement avec un minimum d'animaux par condition de durée d'anesthésie croissante puis d'hyperthermie croissante. Les animaux seront observés en continu, et des soins leurs seront apportés. Un enregistrement de paramètres physiologiques critiques – température corporelle, pression sanguine, sera réalisé. La phase de réveil sera étroitement surveillée afin de s'assurer que les animaux récupèrent. En cas de signes de

souffrance l'animal sera aussitôt euthanasié et le protocole d'étude adapté. Cette partie comprendra au maximum 30 animaux.

Dans la seconde partie, des animaux porteurs de tumeurs seront utilisés dans les conditions définies dans la première partie pour tester l'activité anti-tumorale de l'hyperthermie globale seul ou combinée avec des doses suboptimales de chimiothérapies. Cette deuxième partie utilisera un maximum de 384 animaux soit au total un maximum de 414 animaux.

7394 L'évaluation des interactions possibles et des effets secondaires potentiels des dispositifs médicaux mis en contact avec le corps humain est exigée par les autorités réglementaires. En particulier lorsque ces dispositifs médicaux sont destinés à être en contact avec le sang, des tests de thromboresistance sont à mettre en place. Ces tests permettent de déterminer si ces dispositifs favorisent la formation de thrombus ou caillots.

Le but de ce projet est de tester l'effet de dispositifs médicaux sur la thromboresistance des vaisseaux sanguins en comparaison avec des dispositifs médicaux déjà mis sur le marché lorsqu'ils sont placés chirurgicalement dans la lumière des veines jugulaires de moutons ou de chiens qui sont les espèces reconnues pour l'évaluation de la compatibilité des biomatériaux. Au bout de quelques heures après la chirurgie (4h-6h), les animaux seront euthanasiés et l'évaluation d'une éventuelle formation d'une thrombose de la veine au niveau du dispositif sera réalisée.

A ce jour, aucun modèle in vitro ni méthode alternative ne permet d'étudier ces effets sur la thromboresistance. Il est donc indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier ce phénomène.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser 3 études par an et par espèce soit 15 études par espèce en 5 ans.

Chaque dispositif à tester fera l'objet d'une étude. Le nombre d'animaux sera toujours réduit au minimum et sera compris entre 3 à 6 animaux en tenant compte de la variabilité des résultats attendus.

Au total, au maximum 60 chiens et 60 montons pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet.

Toute intervention sur l'animal sera effectuée par une personne habilitée et expérimentée afin de réduire au minimum le stress. L'implantation du dispositif sera réalisée par un chirurgien expérimenté sous anesthésie générale. Après implantation, l'animal sera maintenu sous anesthésie générale jusqu'à euthanasie.

7395 Le diabète est une maladie chronique considérée comme une épidémie en raison de son incidence croissante à l'échelle mondiale. Selon l'organisation mondiale de la santé (oms), le nombre de personnes diabétique était d'au moins 217 millions en 2005. En l'an 2030, l'OMS prévoit que ce nombre passera à au moins 366 millions. Les maladies cardiovasculaires, l'hypertension et l'insuffisance rénale sont les causes les plus fréquentes de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de diabète de type 1 ou de type 2. Bien que les stratégies thérapeutiques établies, telles que le contrôle approprié de la glycémie, le contrôle de la pression artérielle avec le blocage du système rénine-angiotensine et l'abaissement des lipides avec les statines, soient utilisées pour traiter le diabète, la maladie rénale diabétique (ou néphrose diabétique) n'est pas traitée et nécessite à l'état final des hémodialyses contraignantes et coûteuses. Une fois que la fonction rénale commence à diminuer, elle peut entraîner une fréquence plus élevée d'événements rénaux et extra-rénaux, y compris des événements cardiovasculaires. Par conséquent, ralentir le déclin de la fonction rénale est l'un des principaux domaines d'intérêt dans la recherche sur la néphropathie diabétique, et de nouvelles stratégies sont nécessaires pour prévenir la progression de la maladie du rein diabétique. Nous proposons d'étudier chez la souris de façon longitudinale, d'une part, les changements hémodynamiques et métaboliques rénaux par prélèvement de sang et d'urine et d'autre part, les changements de biomarqueurs structuraux et fonctionnels in-vivo dans le rein, au travers des approches d'imagerie optique 3d macroscopique non invasives. Ces approches d'imageries seront complétées de façon terminale par de la micro-endoscopie confocale in-vivo invasive visant à étudier des biomarqueurs structuraux et la fonction du rein au niveau microscopique (biomarqueurs caractéristique de la pathologie). Des études histologiques pourront être réalisées ensuite sur des organes prélevés après euthanasie de l'animal. Ces études seront réalisées suite à une fibrose initiée par ligature de l'uretère gauche (uuo) et appliquée antérieurement, à un diabète de type1 induit par

une substance toxique : la streptozotocine ou à un diabète de type 2 via un régime alimentaire gras et/ou riche en sucres. La démonstration de l'aggravation de cette condition pro-fibrotique rénale par le diabète, permettra de tester de nouvelles thérapies pour l'insuffisance rénale liée au diabète. Ce projet a pour objectif de sélectionner parmi les composés synthétisés par les chimistes, ceux qui auront la plus grande efficacité chez les patients diabétiques présentant des dysfonctionnements rénaux. Etant donnée la complexité du système rénal et des différentes régulations hautement intégrées auxquelles sont soumis les reins, il n'existe pas de modèle alternatif à l'expérimentation animale pour aborder cette problématique. Dans le but de limiter le nombre d'animaux impliqués dans les études, la sélection des composés a visée thérapeutique sera réalisée in vitro sur des modèles cellulaires préalablement aux tests vivo. Les animaux seront contrôlés quotidiennement par une personne compétente. Ces contrôles permettront de repérer tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées, de plus, ces contrôles seront enregistrés. Une attention particulière sera portée à la santé des animaux durant la période de 3 jours post-opératoire. Afin de réduire le stress que pourrait ressentir ces animaux, les mesures nécessaires seront prises, en leur mettant à disposition un enrichissement de leur environnement (maisonnettes, bâtons à ronger, musique). Le nombre maximum d'animaux nécessaire à cette étude sera de 6000 souris pour 5 ans

7396 Le muscle strié adulte a la capacité de régénérer complètement après une lésion, grâce à des cellules souches. Ces cellules souches agissent avec leur environnement pour assurer la réparation du muscle tout au long de la vie. Il existe cependant des pathologies musculaires dégénératives (comme la myopathie de Duchenne) au cours desquelles le muscle ne régénère pas et se détériore progressivement, entraînant une mort précoce des patients. Ces pathologies sont dues à un défaut génétique qui induit une détérioration des fibres. Comme les cellules souches sont programmées pour réparer le muscle, la détérioration permanente du muscle enclenche un phénomène permanent de tentatives de régénération. Ceci induit de l'inflammation chronique et de la fibrose qui remplace progressivement le muscle. Ces deux processus ont été peu étudiés dans le muscle squelettique. Le projet vise à comprendre les rôles des cellules qui sont impliquées dans l'inflammation chronique et la fibrose dans ces pathologies dégénératives.

Nos études utilisent de la culture cellulaire, à partir de cellules humaines, mais également de cellules murines. Ces expériences in vitro sont couplées à des expériences in vivo, nécessitant le recours aux animaux (souris). Si les interactions cellulaires peuvent être étudiées in vitro, il est indispensable de valider leur importance dans les modèles pathologiques in vivo. C'est indispensable pour des essais à l'échelle préclinique. Donc un modèle animal reproduisant au plus proche la pathologie humaine est nécessaire pour les études précliniques.

Ce projet utilise 540 souris. Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

- Réduction du nombre d'animaux, remplacement : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum, grâce aux analyses statistiques passées disponibles dans l'équipe sur la procédure utilisée. Les tissus musculaires des animaux sont conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire ce qui permet de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures en fonction de l'avancement des connaissances sans recours à des animaux supplémentaires. De plus, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, des expériences de culture cellulaire sont d'abord menées afin d'établir les faits biologiques, qui sont ensuite validés in vivo.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : Des microlésions sont réalisées dans un muscle de l'animal, sans conséquence clinique, et un anesthésique est utilisé pendant l'expérimentation afin de réduire le stress et la douleur des animaux. Les animaux sont, outre l'observation quotidienne, observés au décours des expérimentations. Les points limites, clairement établis, seront strictement observés.

- Des procédures de raffinement des protocoles sont observées afin d'enrichir l'environnement des animaux au cours de la procédure.

Les fonctions du système nerveux central sont principalement expliquées par le rôle prépondérant que jouent les neurones. Ainsi les états de vigilances sont dus aux changements de l'activité neuronale. Bien que de nombreuses avancées dans le domaine aient été réalisées, la nécessité des changements d'activité neuronale qui se produisent lors des différentes phases du sommeil reste peu comprise. Il ressort pourtant que le besoin vital de dormir met en jeu des mécanismes permettant au

système de se « réinitialisé ». Il est probable qu'outre les neurones, les cellules de soutien des neurones, les cellules gliales, participent à la remise à zéro du système. La contribution des cellules gliales est pourtant peu étudiée. Le but de ce projet est de déterminer le rôle des cellules gliales dans les différents états de vigilance. Nous étudierons ces cellules sur un modèle de souris transgénique. Les mouvements des prolongements de certaines cellules gliales seront étudiés par microscopie sur des animaux vigiles habitués à la contention. L'étude des mouvements des cellules gliales nous permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires qui se produisent durant les phases de sommeil et ainsi de mieux comprendre la nécessité du sommeil dans les mécanismes de mémorisation.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en raffinant notre procédé de contention et en réalisant des habituations de nos souris à la manipulation. Le nombre d'animaux utilisés sera restreint au maximum (55 souris).

Ce type d'étude se faisait jusqu'à présent essentiellement sur des modèles primate non-humains. Avec cette approche nous voulons tirer parti des avantages qu'apporte la souris (les modèles génétiques) pour améliorer notre compréhension des mécanismes de mémorisations mis en jeu durant les cycles veille/sommeil et des interactions cellulaires qui les sous-tendent. Les résultats obtenus dans cette étude permettront d'identifier de nouvelles cibles cellulaires et moléculaires impliquées dans les pathologies du sommeil et de la mémoire.

7397 La peau, de par sa localisation participe au maintien de la température corporelle. Plus spécifiquement, l'hypoderme, compartiment le plus profond de la peau située, comme son nom l'indique sous le derme, est constitué du tissu adipeux blanc sous cutané. Il est le premier rempart aux chocs thermiques corporels. Ce tissu graisseux est d'épaisseur variable. L'hypoderme est constitué de cloisons conjonctives qui déterminent des lobules chargés de stocker les adipocytes. Les tissus adipeux (blanc sous cutané ou viscéral et brun) agissent en collaboration au sein d'un véritable organe adipeux, qui contribue, de façon significative, à la régulation de l'homéostasie. Une dérégulation des tissus adipeux, par exemple dans le cas de l'obésité, conduit souvent au développement d'une insulino-résistance qui peut évoluer en diabète de type 2. La prévalence de l'obésité et des pathologies associées a atteint des proportions d'épidémie mondiale et il est prévu que le nombre de personnes obèses doublera dans certains pays dans la décennie à venir.

Un modèle murin de KO constitutif dermique de la protéine CD98hc, un co-récepteur intégrinique et chaperonne de transporteur d'acides aminés, présente des défauts de l'hypoderme mais également des tissus adipeux viscéraux au cours du vieillissement. Notre objectif est d'étudier le rôle de CD98hc dans la physiopathologie du tissu adipeux au cours du vieillissement. Nous étudierons donc : 1) la glycémie et l'insulinémie soit i) au cours du vieillissement, soit ii) en condition de régime alimentaire riche en graisses (obésité) ; 2) l'évolution du tissu adipeux en condition de thermo-neutralité.

Pour répondre aux exigences des 3R, le suivi quotidien des animaux sera assuré grâce à une fiche de score qui permettra de surveiller objectivement l'état des animaux (Raffinement). Les souris seront euthanasiées en fin d'expérimentation ou lorsque le point limite sera atteint. Ce point limite est défini par un état général de l'animal non satisfaisant (cf. fiche de score) ou l'accumulation de plusieurs symptômes suivis par fiche de score. La coagulation sera confirmée après prélèvement sanguin et avant la fin de l'expérimentation. Les prélèvements seront espacés dans le temps et les volumes minimums (Cf. détails procédures) afin de préserver le bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été déterminé afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir du nombre minimum d'animaux (Réduction). Aussi souvent que possible, les expériences ont été et seront réalisées in vitro sur des cellules en culture (Remplacement). Cependant, la complexité des tissus adipeux, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Les expériences seront effectuées en limitant le niveau de stress des animaux, en particulier, en limitant au maximum les animaux isolés pendant l'expérimentation et un soin particulier sera apporté à l'enrichissement de l'environnement. Le nombre total de souris nécessaires est de 468 souris sur 5 ans.

7398 Il existe de nombreuses formes de surdité que l'on peut classer en deux catégories générales : « centrale » ou « périphérique ». Les surdités périphériques sont relativement bien connues et diagnostiquées par l'audiogramme: elles sont la conséquence de problèmes biomécaniques ou neurologiques dans les structures périphériques au système nerveux central (oreille moyenne, cochlée, nerf auditif). Cependant, l'origine des surdités centrales est moins bien connue. En effet, certains patients présentent des audiogrammes normaux mais se plaignent de difficultés à comprendre la parole, en particulier dans les environnements bruyants. Ces formes de surdité seraient liées à des problèmes de traitement par le système nerveux central. L'objectif du projet est d'étudier comment les surdités centrales peuvent apparaître à la suite d'épisodes de surdité périphérique (par exemple en souffrant d'otites à répétition). Notre modèle d'étude est le chinchilla, dont l'audition sera artificiellement modifiée par une aide auditive digitale placée dans le canal auditif. Nous testerons ensuite par des méthodes électrophysiologiques le fonctionnement du système nerveux au niveau du tronc cérébral de ces sujets avec et sans modification artificielle de l'audition.

Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension de l'adaptation du système nerveux central à un environnement auditif modifié, ainsi que le développement d'un outil de diagnostic potentiellement transposé chez les sujets humains.

Ce projet, qui comporte une procédure de sévérité modérée, occasionnera assez peu d'effets néfastes chez les animaux qui porteront des aides auditives similaires à celles portées par les personnes malentendantes. Pour éviter de possibles infections de l'oreille moyenne (otites), les aides auditives seront enlevées régulièrement afin de nettoyer le canal auditif. Les mesures non invasives d'électrophysiologie seront effectuées sous anesthésie longitudinalement une fois par semaine pendant la durée du protocole afin de suivre l'évolution de l'effet des aides auditives sur le traitement de l'information sonore. A la fin de l'expérience, des mesures électrophysiologiques extracellulaires seront effectuées sur les neurones du tronc cérébral auditif (sous anesthésie et sans réveil).

Il n'y existe pas pour l'instant de modèle permettant l'étude du fonctionnement des systèmes nerveux sensoriels sans avoir recours à l'animal. Notamment afin de pouvoir mesurer les réponses de neurones, et donc comprendre le système auditif et sa plasticité. L'utilisation de chinchillas est courante dans l'étude de l'audition en général, et des pathologies de l'oreille moyenne en particulier, puisque ces animaux ont un système auditif remarquablement similaire à celui des êtres humains, et entendent les mêmes fréquences (par opposition à d'autres rongeurs). Particulièrement utile pour cette étude, le canal auditif du chinchilla permet la pose d'aides auditives à la taille destinée aux humains. Enfin, l'utilisation de mesures non-invasives longitudinales permet la réduction du nombre de sujets étudiés sans réduire la portée scientifique de l'expérience.

Nous étudierons un maximum de 120 chinchillas sur 5 ans. Ce nombre d'animaux a été ajusté afin d'assurer nos obligations de réduction tout en servant les objectifs scientifiques du projet. En plus de notre expérience dans la conception d'études de ce type, ce chiffre repose sur une estimation statistique basée sur des données antérieures, ainsi que l'équation de ressource de Mead. Les animaux seront hébergés en groupe dans des conditions de température et d'hygrométrie correspondant à leurs habitudes.

7399 L'augmentation du nombre de personnes en surpoids ou obèses a atteint au 21ème siècle un stade qualifié d'épidémique. L'obésité est un facteur de risque majeur de diabète de type 2, puisque que 90% des patients sont en surpoids ou obèses. En 2025, le nombre de diabétiques dans le monde devrait dépasser 400 millions. Le surpoids et l'obésité sont les conséquences d'un déséquilibre énergétique qui entraîne une augmentation du stockage des graisses dans les adipocytes blancs. Une des stratégies pour traiter le diabète de type 2 associé à l'obésité consiste à augmenter la dépense énergétique en stimulant la formation et l'activité des adipocytes bruns pour générer de la chaleur en utilisant des acides gras et du glucose. Il a été également montré que le tissu adipeux du sujet obèse est caractérisé par une inflammation pouvant conduire à des désordres métaboliques tels que l'insulino-résistance. Cette inflammation favorise l'infiltration macrophagique du tissu adipeux et la transformation des macrophages anti-inflammatoires (M2) en macrophages inflammatoires (M1). L'impact du recrutement et de l'activation des adipocytes bruns sur cette situation inflammatoire est encore inconnu alors qu'il s'agit d'une notion essentielle de la pathologie du syndrome métabolique.

Nos résultats in vitro montrent que les adipocytes bruns humains sont capables de répondre à un stimulus inflammatoire (comme le lipopolysaccharide « LPS ») et que cela engendre une sécrétion de cytokines et de dérivés lipidiques inflammatoires plus faible que celles observées avec des adipocytes blancs, mais une expression plus forte d'IL1RA, antagoniste de l'IL-1b. Cette sur-expression d'IL1RA est particulièrement intéressante car cette cytokine est capable de bloquer les effets inflammatoires dans le tissu adipeux, mais aussi l'impact de la leptine sur la fièvre. Basés sur ces données in vitro, nous voulons maintenant démontrer in vivo que les adipocytes bruns jouent un rôle immunomodulateur au sein du tissu adipeux dans une situation inflammatoire et/ou infectieuse. Pour cela nous utiliserons 432 souris BALB/C réparties de manière équivalente dans 3 procédures expérimentales. Ces souris seront traitées pour stimuler la formation et l'activation d'adipocytes bruns et utilisées ensuite dans des expériences d'infection bactérienne et d'inflammation systémique et locale par le LPS. Cela permettra de mettre en évidence la capacité des adipocytes bruns à limiter l'inflammation et de déterminer les partenaires moléculaires et cellulaires mis en jeu.

Toutes les approches réalisables in vitro ont été menées en remplacement de l'expérimentation animale et ont permis de valider nos hypothèses de départ et de caractériser en partie les mécanismes impliqués. Dans un souci de réduction, les procédures prévues en triplicat pourront n'être réalisées qu'en duplicat si les deux premières expériences donnent des résultats statistiquement significatifs (réduction d'un tiers du nombre d'animaux). Dans un souci de raffinement, les procédures seront effectuées par du personnel formé et habilité, dans le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux et en présence de dispositifs d'enrichissement de milieu dans les cages. Enfin, aucune douleur n'est attendu dans les conditions expérimentales décrites. Aucune médication ne sera utilisée, également pour éviter tout risque d'interférence avec les phénomènes observés.

Les cancers du sein sont composés d'un ensemble de sous-types différents, dont le sous-type moléculaire apocrine (MA). Ces tumeurs sont caractérisées par l'expression du récepteur aux androgènes (AR) et l'absence d'expression du récepteur aux estrogènes (ER). Ce sous-type représente 10% des cancers du sein, soit 5000 nouveaux cas par an en France. Malgré un traitement par chimiothérapie bien conduit, 45% des tumeurs MA rechutent dans les 5 ans sous forme de métastases. Ce taux élevé de rechute souligne la nécessité de développer d'autres options thérapeutiques, notamment les traitements anti-androgéniques.^[SEP]La tolérance et l'efficacité d'un nouvel inhibiteur sélectif a été évalué dans un essai clinique de phase II multicentrique réalisé chez des patientes atteintes de cancers du sein avancés ou métastatiques du sous-type MA. Vingt pourcent des patients inclus ont présenté un bénéfice clinique et une réponse complète a été observée.^[SEP]Une étude génomique cherchant à identifier des facteurs prédictifs potentiels de réponse à ce nouvel inhibiteur chez les patientes traitées dans l'essai clinique a montré qu'un gène nommé CHK1 était sous exprimé chez les patientes en réponse au traitement anti-androgénique.

En culture cellulaire, des expériences de combinaison de drogues (inhibiteur d'une protéine du cycle cellulaire associé au traitement anti-androgénique utilisée chez les patientes) ont été réalisées sur deux lignées cellulaires mammaires moléculaires apocrines. Nous avons montré que cette combinaison majore les lésions fatales sur l'ADN des cellules tumorales amenant à leur mort.

Nous devons maintenant confirmer ces résultats par une étude chez la souris (in vivo), étape nécessaire pour obtenir la validation de cette cible thérapeutique dans un contexte physiologique et permettre l'ouverture d'un essai clinique pour les patientes. Ces expériences seront réalisées sur des souris femelles NSG. La greffe des cellules MDA-MB-453 et SUM185PE sera effectuée en orthotopique directement dans la glande mammaire. Trois semaines après la greffe, les différents traitements seront administrés seul ou en combinaison pour évaluer leurs effets.^[SEP]Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos lots témoins dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts, l'enrichissement de leur milieu de vie sera systématique. Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 180 animaux sur 2 ans.

7400 Le sepsis (association d'une infection et d'une réaction inflammatoire non contrôlée) est une des principales causes de mortalité dans les unités de réanimation, avec plus de 26% de décès directement attribuables. La mortalité du choc septique est en moyenne de 50% mais peut atteindre

90% en cas de défaillance multi-viscérale. Parmi l'ensemble des défaillances d'organes, la défaillance neurologique, est un élément pronostic majeur.

Les effets du sepsis sont systémiques et complexes. A l'heure actuelle, il est très difficile de modéliser ces interactions ou de les reproduire de façon fiable in vitro. Une telle complexité ne peut être encore déconstruite et reconstruite in vitro. Ne pouvant mimer le sepsis in vitro, le modèle animal est donc une nécessité.

Dans le cadre de ce projet, nous aurons recours à des modèles murins sur fonds génétique C57BL/6, car la majorité des souris transgéniques, permettant d'explorer les mécanismes mis en jeu, sont sur ce fonds génétique. De nombreuses publications (de l'unité ou des spécialistes du sepsis, cf pubmed « sepsis and mouse or murine model ») exploitent ce modèle murin pour aborder ce qui est observé chez l'homme.

Le but du projet est de caractériser les effets neuropathologiques du sepsis. En effet, lors d'un sepsis, des lésions aiguës sont observées dans le système nerveux central, entraînant des dysfonctionnements neurologiques avec risques pour la survie du patient ; de même, chez les survivants à un sepsis, des perturbations neurologiques à long terme sont observées, avec une fréquence accrue de décès chez ces individus. La compréhension de ces mécanismes permettra une meilleure prise en charge de ce type de patients et une diminution de la mortalité et morbidité associée. Ce projet a été élaboré dans le souci de réduire au maximum le nombre d'animaux en valorisant chaque euthanasie de souris par sa programmation au sein des différents projets de l'Unité.

Trois procédures sur cinq ans : la première, déclarée de classe sévère par précaution, de mise en place du modèle (630 souris au maximum ; la majorité des animaux relevant de la classe modérée), la seconde de titration de classe modérée (120 souris par titration, avec deux conditions expérimentales (avec ou sans antibiothérapie), 5 fois par an sur cinq ans, soit 6000 souris au maximum), la troisième expérimentale de classe modérée (5250 souris au maximum), soit 11880 souris au maximum.

Ce nombre est un nombre maximum d'animaux susceptibles d'entrer dans les protocoles expérimentaux. Nous ferons le maximum, lors du déroulement de ce projet de recherche, de maîtriser et réduire le nombre d'animaux nécessaires. Cela se fera selon deux approches :

- i) la diminution du nombre de lots de broyats par an nécessaires à préparer, dès que nous aurons finement caractérisé la stabilité des lots, donc diminution du nombre de répétitions pour les titrages.
- ii) la réactivité dans la planification des expériences les plus pertinentes pour aboutir aux réponses aux questions posées dans ce projet et ainsi concrétiser par une publication en utilisant le nombre le plus faible de questions expérimentales posées, donc diminution du nombre de répétitions pour de nouvelles questions expérimentales.

Chaque procédure a été, collégalement et rigoureusement considérée selon la règle des 3R.

Tout est mis en œuvre pour que soient réduit au maximum le nombre d'animaux pour lesquels l'expérimentation relève de la classe de gravité sévère; l'élaboration des protocoles expérimentaux favorisera la diminution du nombre d'animaux concernés, le suivi clinique permettra d'éviter la souffrance des animaux.

Au fur et à mesure du déroulement du projet, il sera recherché la mise en place et le recours à des expériences in vitro aussi souvent que cela sera compatible avec la pertinence et la significativité par rapport au modèle in vivo.

Le calcul du nombre d'animaux nécessaire a été effectué à l'aide de nos données préliminaires, en optimisant afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

7401 Environ 4000 nouveaux cas de sarcomes des tissus mous sont diagnostiqués chaque année en France, ce qui représente à peu près 1% des nouveaux cas de cancer chez l'homme. Les liposarcomes (LPS) représentent environ 20% des sarcomes des tissus mous et sont des tumeurs malignes à la fois rares et hétérogènes. Le traitement d'un LPS repose principalement sur de la chirurgie associée à la radiothérapie. La chimiothérapie est proposée au cas par cas, car ces tumeurs

manifestent une forte résistance au traitement. Dans les cas de LPS récurrents ou métastatiques, on peut proposer un traitement chimiothérapeutique à base de doxorubicine ou de gemcitabine.

Les LPS peuvent être classés en différentes catégories. Nous allons dans notre projet nous intéresser à la classe des liposarcomes différenciés (LPSDD), qui correspondent à des tumeurs sévères de mauvais pronostic. Elles sont caractérisées par une rechute locale quasi-systématique et un risque de métastase de 15-20%. Face à la récurrence de ces tumeurs et l'hétérogénéité de leur sensibilité aux chimiothérapies actuelles, identifier des thérapies efficaces est une nécessité afin d'améliorer le pronostic des patients.

L'ensemble des données acquises au cours de nos travaux in vitro nous conduisent à développer un modèle de xéno greffe de LPSDD de patient chez la souris. Cette étude in vivo est nécessaire afin de mettre en place dans un futur proche des tests cliniques pour les patients atteints de LPSDD.

Dans le cadre de ce projet de recherche, il faudra compter 154 souris sur un an pour pouvoir :

- 1- tester la toxicité de deux traitements chimiothérapeutiques,
- 2- tester l'implantation et le développement de trois nouvelles lignées de cellules tumorales,
- 3- évaluer l'efficacité de la combinaison des deux traitements testés en (1) sur deux lignées xéno greffées de LPSDD (1 lignée de référence + 1 des trois lignées testées en (2)).

Toutes les expérimentations sont réalisées par du personnel compétent et qualifié, le nombre de souris est limité au maximum, le but étant d'obtenir des données statistiquement significatives sur l'efficacité du médicament. Les animaux sont surveillés par le personnel de l'animalerie quotidiennement (weekends compris), hébergés dans des cages comprenant nourriture et boisson à volonté et enrichies par des jeux (tunnels en polycarbonate). Des points limites seront déterminés et au moindre doute sur l'état de santé d'un animal, la Structure du Bien-Etre Animal (SBEA) sera sollicitée et la vétérinaire référente du service pourra être consultée.

7402 Les pathologies de la myéline qui sont invalidantes, douloureuses et/ou handicapantes, peuvent entraîner des conséquences socio-économiques graves comme une perte d'emploi, un manque de productivité, une prise en charge financière élevée pour la sécurité sociale, des dépenses lourdes et une souffrance physique et psychologique majeure chez les patients et/ou leurs familles, ce qui peut générer d'autres problèmes comme la dépression ou l'anxiété pathologique. Le projet de l'Unité vise la production de connaissances dans le but d'élaborer des stratégies permettant de traiter efficacement ces pathologies. En conséquence, il apparaît logique de considérer que les activités de recherche de l'Unité prépareront des réponses directes aux questions socio-économiques générées par les pathologies de la myéline et les maladies du système nerveux. Le principal but du projet est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer dans des modèles expérimentaux des pathologies de la myéline, des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre des causes de déficience de la myélinisation et de souffrance axonale. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies de la myéline, d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la réparation de la myéline et la neuroprotection. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa. Les modèles animaux de souris développés se font dans le respect des règles de 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de score clinique est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (8 animaux par condition expérimentale et 4 animaux pour les groupes véhicules contrôles ; cf paragraphe 3.4.10). Les expériences ne sont pas répétées chez les mâles et une seule fois chez les femelles pour pallier aux variations dues au cycle oestrien. Raffiner : les protocoles sont optimisés lors des expériences in vivo pour que, chez un même animal, plusieurs paramètres soient étudiés (Score clinique, tests de motricité...). De plus, des études de biologie moléculaire, de biochimie et d'immuno-histochimie sont prévues sur les tissus prélevés de ces animaux en fin de PE. Remplacer : les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures cellulaires. C'est ainsi que nous avons développés plusieurs types cellulaires en adéquation avec différentes pathologies par exemple les cellules Jimpy 158 comme modèle d'atteintes myéliniques.

Les animaux sont surveillés tous les jours et les signes cliniques de souffrance sont évalués (posture, aspect du poil, alimentation et poids). L'euthanasie des animaux est réalisée par des méthodes appropriées et autorisées et des personnes expérimentées (niveau II minimum).

Les objectifs du projet sont:

- Disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies de la myéline
- Utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation
- Mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la réparation de la myéline et la neuroprotection
- Permettre le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa.

L'effectif global pour ce projet sera de 1360 souris sur 5 ans.

7403 Staphylococcus aureus est une bactérie pathogène particulièrement fréquente dans les infections acquises en ville (« communautaires ») et les infections acquises à l'hôpital (« nosocomiales »). Ce pathogène, en dehors du fait qu'il soit associé à une résistance élevée aux antibiotiques, est également doté d'un grand nombre de facteurs de virulence et de toxines. Parmi ces toxines, la toxine de Panton et Valentine (ou « PVL ») est produite par moins de 5% des souches circulant en France mais est plus fréquemment retrouvée dans certaines autres régions géographiques, en particulier aux USA. Elle est associée à des tableaux cliniques divers, tels que des infections cutanées (furunculose), ostéo-articulaires, mais également des infections respiratoires basses encore appelées pneumonies nécrosantes, en particulier chez l'enfant et le jeune adulte sans facteur de risque. Ces infections sont associées à une mortalité extrêmement rapide, même lorsqu'elles sont prises en charge précocement. Les antibiotiques à activité anti-toxinique utilisés dans cette pathologie constituent la pierre angulaire du traitement à l'heure actuelle. Toutefois, ils ne suffisent pas à réduire la mortalité de façon significative.

Dans ce contexte, d'autres alternatives innovantes (anticorps) sont actuellement en développement et visent à neutraliser la ou les toxines pathogènes produites par S. aureus afin d'en diminuer la virulence.

Ces anticorps sont actuellement à l'étude dans des modèles pré-cliniques. Considérant que la souris n'est pas sensible à l'action de la toxine PVL, le choix s'est porté sur une autre espèce animale, le lapin, qui constitue un modèle de choix pour l'évaluation de l'efficacité de thérapeutiques dans les infections à S. aureus produisant la toxine PVL.

Le but de cette étude est donc d'évaluer l'efficacité de différentes doses du cocktail d'anticorps ASN100 (constitué de 2 anticorps ASN-1 et ASN-2) dans un modèle de pneumonie nécrosante à Staphylococcus aureus chez le lapin. La durée de l'étude sera de 6 mois.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière a été apportée au respect de la règle des 3R. Le nombre d'animaux nécessaire pour répondre aux hypothèses et permettre une analyse statistique robuste a été réduit à 8 par groupe (au lieu de 10) grâce aux améliorations techniques de la procédure et à l'expérience acquise lors d'études précédentes. Plusieurs éléments ont été mis en place pour répondre au concept du raffinement : Le design du gilet utilisé pour le maintien du cathéter et permettant la libre circulation de l'animal dans sa cage a été amélioré pour en accroître son confort. Les conditions d'hébergements ont également été optimisées par l'enrichissement du milieu. Enfin, l'utilisation de l'analgésique buprénorphine a été mise en place pour réduire la douleur post-opératoire. Dans le contexte de l'étude, le remplacement du modèle in-vivo pour la constitution d'une pneumonie expérimentale par un autre système n'était pas envisageable notamment pour des aspects de diffusion tissulaire et systémique.

Au total pour cette étude, 250 lapins New Zealand seront nécessaires. Une évaluation rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

7404 L'imagerie biomédicale est l'une des disciplines les plus actives dans le domaine de la recherche médicale dans le monde. Le développement de nouvelles méthodes en imagerie biomédicale, et

notamment en IRM, est soutenue par l'enjeu sociétal de déterminer des biomarqueurs les plus précoces dans l'évolution de pathologies, de la manière la plus non-invasive possible. Cela se traduit par un marché global pour les technologies en bio-imagerie qui devrait atteindre 37,4 milliards de \$ d'ici 2017.

Dans ce contexte, l'objectif du projet est de mettre au point, optimiser et développer de nouvelles séquences d'imagerie IRM afin d'offrir le plus grand panel de méthodes IRM pour la caractérisation et la recherche de biomarqueurs de pathologies.

L'IRM, technique d'imagerie biomédicale en perpétuelle évolution, est extrêmement attractive pour les études précliniques. Elle est non invasive et non irradiante. Elle permet :

- de remplacer l'utilisation de techniques plus invasives pour l'obtention d'information similaire ;
- d'avoir des informations anatomo-fonctionnelles complémentaires et/ou inaccessibles par d'autres techniques dans des conditions de bien-être animal sans comparaison. Ces nouvelles informations peuvent être intégrées dans une étude pour la raffiner comme nouveau critère d'inclusion ou d'exclusion. Cela permet d'obtenir une meilleure qualité des résultats qui n'auront pas besoins d'être répétés, réduisant ainsi le nombre d'animaux;
- un suivi longitudinal individuel des modifications anatomo-fonctionnelles permettant ainsi de réduire très significativement le nombre d'animaux nécessaires ;
- d'avoir accès à des informations déjà utilisées chez l'homme quotidiennement dans les services hospitaliers, permettant de développer des projets de recherche translationnelle.

L'IRM offre, à travers plus d'une centaine de séquences, un très large panel d'images avec des contrastes différents, basées essentiellement, sur les caractéristiques physiques des protons de l'eau donnant ainsi accès à différentes informations telles que des informations morphologiques (structurale et basée sur la diffusion de l'eau dans le tissu), paramétriques (mesures quantitatives), fonctionnelles (basée sur l'oxygénation tissulaire, perfusion), et sur le métabolisme. Des agents de contraste exogènes sont nécessaires pour certaines problématiques comme l'observation de la perméabilité vasculaire, le rehaussement du contraste dans une structure d'intérêt.

Malgré la présence par défaut d'un certains nombres de séquences sur la machine, le paramétrage de ces dernières a été déterminé par le constructeur avec des bobines données, à un champ magnétique donné, sur des objets tests. Autrement dit, ces paramètres ne sont pas optimisés pour la plupart de nos besoins. Pour chaque séquence, entre 10 à 20 paramètres sont ajustables pour son optimisation et mise au point : résolution spatiale, temps d'acquisition, rapport signal à bruit, diminution des artefacts, sensibilité aux mouvements physiologiques, organe ou structure à visualiser, ... En parallèle, la communauté de scientifiques spécialisés en IRM étant très active, de nouvelles séquences apparaissent tous les ans dont l'intérêt est démontré à travers la publication d'articles. Ce dynamisme oblige les plateformes IRM telle que la nôtre à mettre au point et tester ces séquences sur ces propres équipements. Ce travail des sciences de l'ingénieur doit être réalisé en amont de tout projet, afin de s'assurer de la faisabilité lors du dépôt du projet.

Le rongeur (souris, rat) est depuis toujours le modèle de prédilection pour la recherche biomédicale, par sa taille, son coût, sa manipulation aisée et son taux élevé de reproduction. Il est utilisé comme modèle standard pour l'étude de la plupart des pathologies. Il représente ainsi à lui seul environ 80% des expériences menées sur animaux (Union Européenne, 2008).

Une première partie de mise au point des séquences se fera sur des objets tests ou des tissus fixés afin de remplacer et réduire au maximum l'utilisation d'animaux. Mais au vue de la complexité des tissus in-vivo dont les caractéristiques IRM sont propres, l'utilisation d'animaux sera incontournable. Pour ce faire, nous considérons avoir besoin sur les 5 ans de 1000 animaux (rats et souris confondus). Nous avons estimé que 5 rats et 5 souris peuvent être présents simultanément pour nos besoins afin de s'assurer que tous les animaux ont une semaine entre 2 examens IRM pendant une période allant jusqu'à 6 mois. Ce délai pourra être de minimum 24h en cas d'utilisation d'agent de contraste tel que le manganèse.

L'isoflurane est utilisé comme anesthésie au début de la procédure pour permettre l'installation du cathéter en sous-cutanée et de l'animal dans l'IRM sans induire ni stress, ni douleur. Pendant l'examen IRM, la température et la respiration des animaux sont en permanence surveillées par un système de monitoring. En cas de chute de la température et/ou de la respiration non gérable, l'acquisition en cours est immédiatement interrompue et l'animal sorti de l'IRM. Il est alors placé dans une cage mis sous une lumière chauffante jusqu'à son réveil, sous surveillance.

7405 Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des premières causes de mortalité dans tous les pays industrialisés. Par exemple, en France, environ 120 000 personnes subissent un infarctus du myocarde, chaque année. Malgré une amélioration de la prise en charge de la crise, 10% décèdent rapidement et 18 000 personnes mourront dans l'année. De nouveaux médicaments sont nécessaires pour le traitement de la phase aiguë et pour la prévention des conséquences à long terme, à savoir le développement progressif d'une insuffisance cardiaque congestive. Dans ce domaine, la recherche de nouveaux traitements est initiée *in vitro*, sur des cellules humaines d'intérêt (cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires vasculaires...). Elle a pour objectif de fournir des indications sur la manière dont les nouveaux produits agissent sur les mécanismes/cibles impliqués dans les différentes phases de la pathologie. Afin d'orienter les études *in vivo* il est capital de pouvoir disposer de modèles *in vitro* ou *ex vivo* pertinents, prédictifs et informatifs, afin d'optimiser au plus tôt l'efficacité des nouveaux principes. Cette stratégie permet de limiter considérablement le nombre d'animaux qui seront utilisés plus tard au cours de la phase *in vivo*. Dans notre centre de recherche, deux approches *in vitro* complémentaires sont utilisées. La première fait appel à des tests cellulaires sur cellules en culture ou récemment isolées de rongeurs, obtenues à différents stades de développement de l'animal donneur. La seconde fait appel à des études sur organes entiers isolés (en particulier le cœur) et maintenus dans des conditions de survie qui peuvent, lorsque nécessaire, mimer certaines pathologies humaines. Dans ce type d'étude, une expertise bio-statistique permet d'optimiser le schéma expérimental en définissant le nombre d'animaux à utiliser.

Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, nationales et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations), et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 9000 rats, 7000 souris et 900 cobayes sur 5 ans.

7406 La leucémie lymphoïde chronique (LLC) est la plus fréquente des leucémies survenant chez l'adulte, principalement après l'âge de 50 ans. Elle touche des cellules du sang appelées les lymphocytes B (LyB), qui sont produits par la moelle osseuse. Les LyB jouent un rôle important au niveau du système immunitaire, en aidant à la défense contre les agents infectieux (bactéries, virus, champignons...). Au cours de la LLC, une partie des LyB ne meurt plus et va s'accumuler dans le sang, les ganglions, la rate et la moelle osseuse.

ZAP-70 est une protéine qui normalement n'est pas présente dans les LyB. Dans la LLC, cette protéine est par contre exprimée dans les LyB leucémiques et est associée à une progression plus rapide de la maladie, ainsi qu'à un risque plus important de présenter une destruction accélérée des globules rouges (hémolyse) menant à une baisse du chiffre d'hémoglobine (anémie), et/ou une destruction accélérée des plaquettes menant à une baisse du chiffre de ces dernières (thrombopénie). Ceci est lié à la présence anormale dans le sang du malade de certains anticorps dirigés contre les propres globules rouges et/ou plaquettes du malade (auto-anticorps). On parle alors d'anémie hémolytique et de thrombopénie auto-immunes (cytopénies auto-immunes, CAI). De façon étonnante, il a été démontré que ces auto-anticorps étaient produits par les LyB non leucémiques. ZAP-70, en favorisant le signal médié par le récepteur membranaire des LyB (BCR pour B cell receptor) pourrait ainsi faciliter la progression des cellules tumorales, ainsi que les CAI car les anomalies moléculaires sensibilisant le BCR sont connues pour induire des phénomènes auto-immuns (rupture de tolérance).

D'autre part, l'expression de la protéine ZAP-70 ne semble pas restreinte aux LyB tumoraux. En effet, nous avons montré pour la première fois dans notre laboratoire que ZAP-70 était aussi présente dans les LyB non leucémiques des patients atteints de LLC. La survenue de CAI chez ces patients était fortement associée à l'expression de ZAP-70 à la fois par les LyB tumoraux et non tumoraux. De plus, des études ont montré la présence de LyB non tumoraux ZAP-70+ dans les amygdales et la rate de patients sains non LLC. Ces cellules n'ont pas été détectées dans le sang périphérique. A ce jour, la signification et les conséquences de cette présence anormale de ZAP-70 dans les LyB non tumoraux est inconnue. Ainsi, le but du projet est d'étudier si la présence anormale de ZAP-70 dans les LyB non leucémiques pourrait favoriser la transformation de ces LyB en cellules tumorales et favoriser aussi la survenue de manifestations auto-immunes.

Pour approfondir nos données préliminaires, nous devons avoir recours à un modèle in vivo. En effet, il permettra d'étudier, sur un organisme entier, l'impact de l'hyper-expression précoce de la protéine ZAP-70 dans les LyB. Les mécanismes de progression tumorale et d'auto-immunité étant complexes et mettant en jeu des coopérations cellulaires multiples dans différents organes lymphoïdes, ceci ne serait pas accessible en parcours de soins courant chez l'Homme (règle du Remplacement).

Concernant les modèles in vivo, la souris est le modèle approprié afin d'étudier la rupture de tolérance car les connaissances chez la souris sont très développées dans le domaine de l'auto-immunité et de l'immunité en général.

Ainsi, nous avons produit un nouveau modèle transgénique murin knock in ZAP-70 qui a été croisé avec des souris transgénique Mb1-Cré, permettant de sur-exprimer spécifiquement et précocement ZAP-70 dans LyB (dès le stade ProB médullaire). Ce modèle original ZAP-70+/Mb1-Cré+ sera dénommé par la suite pour plus de simplicité ZAP-70+.

Il nous offre ainsi l'opportunité d'effectuer des investigations précises in vivo impossible chez l'Homme, notamment concernant les éventuelles altérations précoces du développement des LyB induites par cette surexpression anormale de ZAP-70 dans les LyB, mais aussi par un suivi prospectif à la recherche d'apparition d'auto-immunité et/ou d'une lymphoprolifération.

Pour toutes les expériences, des souris porteuses du transgène ZAP-70 mais ne l'exprimant pas (ZAP-70+/Mb1-Cré-), serviront de contrôle notamment afin d'éliminer un éventuel effet du transgène seul, et seront dénommées pour la suite CTRL.

Ce projet comprend 4 objectifs :

- I. Confirmation de la surexpression spécifique de ZAP-70 dans les LyB dès le stade proB chez les souris ZAP-70+, et étude du phénotype des souris à l'état basal (phénotype cellulaire, prolifération et apoptose cellulaire spontanée, production d'anticorps)
- II. Etude in vivo de l'activation, prolifération, apoptose, ainsi que de de la réponse anticorps et de la production de cellules sécrétrices d'anticorps sous immunisations T-dépendantes et T-indépendantes
- III. Etude in vitro de la signalisation du B Cell Receptor (BCR)
- IV. Etude prospective de l'apparition d'une lymphoprolifération et/ou de cytopénies et/ou d'altération quantitative/qualitative des immunoglobulines (hypogammaglobulinémie, auto-anticorps)

Pour répondre à ces objectifs et afin de pouvoir réaliser des tests statistiques, nous prévoyons d'analyser des groupes de 10 souris ZAP-70+ et 10 souris CTRL pour chaque question posée, soit 120 souris pour le projet global (cf. procédures expérimentales). Les souris seront hébergées à plusieurs dans des cages de taille réglementaire, dans un milieu enrichi, en ne dépassant pas le nombre maximal autorisé de souris par cage. De plus, avant chaque geste technique, les souris seront anesthésiées. Les souris seront observées de manière régulière pour prévenir de toute souffrance.

Considérant le rôle délétère de l'expression anormale de ZAP-70 dans les LyB non tumoraux, si ce projet montre in vivo que cette protéine est impliquée dans la rupture de tolérance des LyB non tumoraux et dans la genèse d'une lymphoprolifération tumorale, ceci pourrait mener à une meilleure compréhension des mécanismes de rupture de tolérance B ainsi qu'à de nouvelles perspectives thérapeutiques pour les patients atteints de LLC en ciblant spécifiquement les LyB non tumoraux ZAP-70+.

7407 Les troubles anxieux et les troubles liés au stress sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développés ont une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, le stress est impliqué dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété et le stress présente de nombreuses limitations de par les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété et du stress par exemple à l'aide de techniques de relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Dans cette situation, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc électrique de très faible intensité lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Ce projet, incluant un maximum de 192 rats, a pour objectif d'identifier le mécanisme d'action du produit E4, dérivant du produit E1 testé précédemment dans notre laboratoire et présentant des propriétés anxiolytiques. Nous souhaitons savoir si l'effet anxiolytique du produit E4 est comparable à celui du produit E1 et s'il est comparable à celui du diazépam ou de la Buspirone, composés pharmacologiques de référence agissant sur des récepteurs différents.

L'administration de Flumazénil, bloquant l'action du Diazépam, anxiolytique de référence, ou de NAN-190, bloquant l'action de la Buspirone, autre anxiolytique de référence, par voie intrapéritonéale (IP), permettra d'identifier la voie pharmacologique du produit E4 administré par voie orale dans le test d'enfouissement défensif conditionné (EDC) chez le Rat mâle Wistar adulte.

Le projet sera découpé en 2 parties : une première étude sur 84 à 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Diazépam et Produit E4 avec et sans traitement avec le Flumazénil) permettra de démontrer si le produit E4 a une activité comparable à celle du Diazépam. Une deuxième étude sur également 84 à 96 animaux répartis en 6 groupes de traitement (Véhicule, Buspirone et Produit E4 avec et sans traitement avec le NAN-190) pour démontrer si le produit E4 a une activité comparable à celle de la Buspirone.

Pour l'ensemble des expériences, les animaux seront habitués au dispositif expérimental pendant les 2 jours précédents le test. Le test de l'EDC sera effectué 80 minutes après le traitement par voie intrapéritonéale et 60 minutes après le traitement par voie orale (Procédure 1). Le comportement des animaux sera enregistré pendant 5 minutes pour étudier différents paramètres suite à la délivrance du choc électrique de faible intensité mais inévitable (Procédure 2), suite à quoi le rat sera sorti du dispositif expérimental et euthanasié si aucune réutilisation des animaux n'est possible ou envisagée. Les animaux seront observés régulièrement tout au long de l'expérimentation et ceux présentant un comportement anormal (agressivité, cachexie, vocalises...) seront exclus de l'étude et euthanasiés en conformité avec les recommandations éthiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement). Les essais effectués permettront de déterminer la voie pharmacologique d'action du produit E4 nécessaire pour réduire l'anxiété des animaux dans le test de l'EDC. Nous utiliserons le nombre minimum d'animaux nécessaire (réduction) permettant une exploitation statistique des résultats. Les expérimentations sont effectuées selon la réglementation et les recommandations en vigueur afin de limiter au maximum l'impact des traitements et du test comportemental sur l'état de stress des animaux, et le

choc électrique sera déclenché manuellement qu'après s'être assuré à l'aide d'une webcam que seules les pattes de l'animal sont en contact avec l'électrode pour minimiser la douleur éventuellement induite (raffinement). Une réutilisation des animaux pourra être envisagée pour le développement de nouvelles procédures expérimentales internes, procédures avec ou sans réveil nécessitant donc ou non le dépôt d'une nouvelle saisine de projet.

7408 Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris nourries avec un régime riche en graisse, à travers une diminution de la masse grasse et une amélioration du contrôle glycémique.

Ce projet se propose de tester plusieurs mécanismes qui pourraient sous-tendre ces adaptations, ainsi que de mesurer les effets d'un arrêt du traitement et d'une reprise après arrêt.

Comme lors de nos expérimentations précédentes, la combinaison d'extraits de végétaux sera ainsi incorporée directement dans la nourriture des animaux.

Le projet inclus 3 sous étapes, qui adresseront chacune une question de recherche :

1/ Mesure de la balance énergétique (3 groupes de 10 souris, durée 4 semaines)

2/ Comparaison de l'effet de l'association de plantes avec des souris matchées par le poids (4 groupes de 12 souris, durée 8 semaines)

3/ Mesure des effets d'un arrêt et reprise de la supplémentation (4 groupes de 12 souris, durée 16 semaines).

Les procédures réalisées sur les animaux sont non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal.

Le modèle de souris de souris saines nourries avec un régime riche en graisse permet de développer une obésité et une insulino-résistance particulièrement adaptés à l'étude d'un produit qui se placera dans une finalité de prévention de facteurs de risques du syndrome métabolique.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 10 à 12 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Ce projet s'inscrit dans le respect de la règle des 3rs, ainsi le nombre d'animaux utilisés est déterminé au minimum de la relevance statistique et une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole. Un nombre maximal de 126 souris seront utilisées pour ces travaux de recherche.

7409 Les adhérences rencontrées sur sites opératoires lors des réinterventions chirurgicales demeurent un problème fréquent et délicat en chirurgie axée sur les tissus mous et plus particulièrement en chirurgie cardiaque.

La problématique réside dans la libération atraumatique des zones à traiter. Ainsi, la possibilité de disposer de systèmes permettant de faciliter cette libération représente alors un intérêt chirurgical et thérapeutique certain. En effet, la facilitation technique lors de la réintervention chirurgicale, outre l'intérêt évident pour le chirurgien, apporte un bénéfice pour le patient en termes de risque opératoire et de réduction de la morbidité peropératoire.

Récemment, il a été proposé un système d'aide chimique à la dissection. Il s'agit d'un produit liquide non toxique qui, lorsqu'il est appliqué directement sur la cicatrice fibreuse, fragilise les liaisons spécifiques des tissus fibreux rendant ainsi plus aisée une dissection chirurgicale. Un travail préliminaire sur la toxicité au niveau cellulaire a été réalisé (ce qui a permis d'utiliser moins d'animaux = remplacement) mais il est incontournable de tester ce système in vivo sur l'animal. Ainsi, ce produit a déjà été évalué avec succès dans des cicatrices fibreuses abdominales mais en vue d'une application clinique chez l'homme en chirurgie cardiovasculaire, nous proposons une étude prospective sur 8 cochons. Ce travail utilisera un modèle porcine car le système cardiovasculaire est proche de celui de l'espèce humaine. (Remplacement)

Cette étude a pour but d'évaluer l'efficacité de ce produit dans la libération des adhérences rencontrées en chirurgie cardio-thoracique et vasculaire.

Nous testerons l'efficacité de ce nouveau système sur 2 situations d'adhérences fréquemment constatées lors des réinterventions chirurgicales sur les mêmes sites opératoires : une adhérence thoracique dans le cadre de l'opération cardiaque et une adhérence tissulaire au niveau inguinale (creux de la cuisse) suite à une intervention vasculaire. Les sites opératoires testés seront l'abord par thoracotomie (ouverture entre les côtes) gauche permettant un accès au péricarde et au cœur ainsi que la région inguinale dans le cadre de l'abord chirurgical de l'artère et de la veine fémorale.

Un total de 8 animaux seront utilisés avec deux sites d'opération chacun. Cela permettra de réduire par 2 le nombre d'animaux utilisés (réduction).

Thoracotomie gauche : elle devra, après ouverture pleurale, se poursuivre par une ouverture de la cavité péricardique. Après ouverture péricardique, le sac péricardique sera refermé et la plaie de thoracotomie sera également refermée sur un drain selon des modalités habituelles et décrites.

Lors de la réouverture, 14 jours plus tard, nous évaluerons les propriétés du produit à fragiliser l'adhésion chirurgicale de façon atraumatique entre le péricarde et le tissu cardiaque.

Zone inguinale : Cette incision présente un intérêt pour le chirurgien cardiaque et vasculaire dans la mesure où les vaisseaux fémoraux (artère et veine) y sont présents. Ces vaisseaux sont très souvent abordés en chirurgie cardiaque (réinterventions pour mise en place d'une CEC périphérique par exemple) ainsi qu'en chirurgie vasculaire. Il y a donc, lors de réinterventions sur cette zone, un risque de léser ces vaisseaux lors de la libération des adhérences chirurgicales. Dans le protocole que nous proposons, l'incision inguinale initiale devra permettre l'exposition des vaisseaux fémoraux. Une fois cette exposition réalisée, la zone inguinale sera fermée puis réouverte 14 jours plus tard. Cette réouverture permettra d'évaluer l'intérêt du produit-test à faciliter l'adhésion de façon atraumatique pour les vaisseaux fémoraux.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires si nécessaire) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent.

Des mesures très complètes de suivis cliniques et paracliniques seront menés selon les protocoles standards mis en place dans notre structure comprenant des points limites afin d'éviter toute souffrance de l'animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, changement dans les comportements non provoqués et réponses comportementales aux stimuli externes. (Raffinement)

A la fin des procédures opératoires, l'animal sera mis à mort selon les règles éthiques en vigueur pour une étude des tissus.

7410 L'obésité et le diabète sont en augmentation constante et représentent une cause majeure de morbidité et de mortalité cardiovasculaire mais également d'autres troubles physiques comme l'apparition d'une sarcopénie précoce chez le sujet obèse. La sarcopénie qui apparaît naturellement après 50 ans se définit par la diminution de la masse et de la force musculaire, associées à une baisse des performances physiques.

L'objectif général de ce projet est d'étudier les interactions entre le vieillissement et les troubles métaboliques (obésité/diabète) qui contribuent à l'altération des voies métaboliques, au développement d'une inflammation chronique, à des dommages de l'ADN, des dysfonctions mitochondriales dans différents tissus et notamment notre tissu cible, le muscle squelettique.

Pour ce faire, Nous utiliserons dans cette étude d'une part des souris dont l'expression d'un gène d'intérêt a été supprimée dans toutes les cellules de l'organisme et d'autre part des souris dont le même gène d'intérêt a été inhibée dans un type cellulaire particulier de cellules résidants dans l'environnement direct (la niche) de la cellule souche du muscle squelettique (la cellule satellite). Les gènes dont l'expression sera spécifiquement supprimée ont été choisis grâce à des études antérieures. Cette étude permettra de comprendre quels sont les gènes impliqués dans l'apparition de la sarcopénie précoce observée chez l'obèse et celle naturellement observée chez le sujet âgé. Cela permettra également les cellules productrices qui interagissent avec les cellules satellites et d'identifier des cibles thérapeutiques.

A ce jour, il est impossible de reconstituer parfaitement in vitro, la complexité des interactions cellulaires existant dans cette niche ce qui rend l'utilisation des animaux nécessaire à la validation des effecteurs moléculaires mis en évidence dans les systèmes de co-cultures cellulaires.

En pratique, dans une première procédure, les différentes lignées d'animaux seront soumises à une diète de 16 semaines avec un régime riche ou pauvre en graisses commencée à l'âge de 8 semaines (sujet jeune) ou 18 mois (sujet âgé) afin d'évaluer les modifications des paramètres métaboliques et l'apparition d'une sarcopénie métabolique chez les sujets en fonction de l'âge. Selon les résultats obtenus, dans une seconde procédure, le muscle étant capable de régénérer après un dommage, nous évaluerons l'impact du régime riche en graisses sur la qualité du processus de réparation tissulaire en induisant une lésion par le biais d'une injection localisée d'une toxine de venin de serpent qui endommage les fibres musculaires.

Pour répondre à l'objectif, des prélèvements musculaires seront réalisés après l'euthanasie des animaux en vue de réaliser des analyses (histologiques, morphométriques et biologiques, expression protéique et génétique) notamment axées sur les marqueurs de la sénescence, de l'inflammation et de la fibrose.

Tout au long de ces études in vivo, nous tâcherons d'appliquer au mieux la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). Ainsi, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme absolument indispensables chez l'animal et permettant la validation d'hypothèses déjà testées in vitro. Toutes les expérimentations suivront des protocoles expérimentaux soigneusement rédigés incluant des points limites qui seront transmis aux personnels techniques afin de limiter la souffrance et le stress des animaux. Nous utiliserons des antidouleurs lors des manipulations douloureuses comme l'induction de la lésion musculaire et l'accès à la nourriture et à l'eau sera facilité. L'environnement sera enrichi avec des maisons en plastique et du coton pour que les animaux puissent faire des nids.

Lors des expérimentations, les animaux mâles seront hébergés maximum par 4 et par 2 après le protocole de lésion musculaire pour leur permettre un comportement social tout en limitant les éventuelles altercations. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'évaluer leur bien-être.

Nous utiliserons des mâles pour nous éviter l'influence métabolique des hormones sexuelles. Le nombre d'animaux par lot sera de 8 compte tenu des variabilités interindividuelles observées dans d'autres études utilisant le même type d'animaux et de protocoles expérimentaux. Le nombre maximum d'animaux utilisés dans cette étude ne devrait pas excéder 4800 souris (30 lignées) sur les 4 années du projet et la procédure de lésion pourra même être annulée si aucun effet n'est observé suite au 16 semaines de diète riche en graisses.

7411 Pour contrôler la survie des neurones, le système nerveux central a besoin d'un microenvironnement spécifique dont le maintien dépend de cellules immunitaires, les microglies. Ces cellules initient les mécanismes de protection immunitaire en conditions physiologiques et pathologiques, de façon à nettoyer le cerveau des débris cellulaires résiduels. En conditions physiologiques, la production de débris dans l'environnement local provient largement de l'activité neuronale. Quand l'activité microgliale ne peut rattraper les demandes, l'homéostasie et l'environnement "propre" ne peuvent être maintenus et les fonctions neuronales en seront altérées. Dans le cerveau, un groupe de neurones situé dans l'hypothalamus est impliqué dans la régulation de l'homéostasie énergétique. Ces neurones contrôlent le destin des nutriments au niveau des organes comme le pancréas, le foie ou les muscles. La plasticité synaptique joue un rôle crucial dans le contrôle de l'homéostasie énergétique par ces neurones hypothalamiques. Des arguments convaincants montrent que l'horloge biologique est impliquée dans le contrôle de l'activité de ces neurones et le besoin de supprimer les débris neuronaux du microenvironnement dépend du temps (jour vs nuit). Ainsi, l'activité de nettoyage par la microglie doit être temporellement synchronisée à l'activité neuronale.

Notre hypothèse de travail est que l'horloge interne de la microglie contrôlant l'activité rythmique de celle-ci, est essentielle pour programmer le nettoyage des débris formés par l'activité des neurones contrôlant l'homéostasie énergétique dans l'hypothalamus.

De plus, nos études préliminaires (non publiées) révèlent que dans un environnement hypercalorique, l'activité rythmique microgliale est altérée, suggérant que le mécanisme de l'horloge intrinsèque de la microglie pourrait être un acteur clé dans le contrôle de la physiologie microgliale. La

désynchronisation entre la microglie et l'activité neuronale pourrait entraîner un microenvironnement local malsain pour la survie des neurones.

Dans ce projet, nous utiliserons un modèle de souris transgénique dans lequel l'horloge biologique intrinsèque de la microglie est altérée (KO du gène de l'horloge *Bmal1*), pour comprendre si et comment le dysfonctionnement de la microglie dans le cerveau affecte l'activité des neurones de l'hypothalamus dans la régulation de l'homéostasie énergétique. En particulier, nous étudierons comment ces souris répondent à un régime alimentaire à forte teneur en graisses.

Règle des 3R. Remplacement : L'évaluation de l'homéostasie énergétique en réponse à un changement d'alimentation ne peut se faire que chez l'animal entier. A ce jour, les modèles in vitro ne peuvent pas rendre compte de la complexité de ces fonctions au niveau de l'organisme. De plus, les analyses seront effectuées non seulement au niveau du cerveau, mais également sur les organes périphériques (pancréas, foie et muscles). Réduction : Le nombre total de souris (144), a été réduit au minimum pour permettre des analyses statistiques fiables sur les souris. En effet, il existe une dispersion de la réponse à un régime alimentaire à forte teneur en graisses, alors qu'environ 1 souris sur 5 n'y répond pas ou peu. Il existe également une disparité entre les mâles et les femelles, l'étude sera réalisée en parallèle sur les deux sexes. Les groupes de souris avec une alimentation normale seront de n=8 et les groupes de souris avec un régime alimentaire à forte teneur en graisses seront de n=10, pour assurer une puissance statistique suffisante. Aussi, afin de restreindre le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet, nous utilisons des géniteurs homozygotes dans les croisements. Ainsi, aucun animal ne sera produit en surnombre car tous les génotypes seront utilisables dans cette étude. Raffinement: Dans ce projet, seule l'alimentation des souris sera différente entre les groupes d'étude. Le geste le plus invasif sera des injections intrapéritonéales (2 injections/animal) d'une drogue conduisant à l'extinction d'un gène de l'horloge biologique (*Bmal1*) intrinsèque de la microglie. Les animaux sont maintenus en groupe de 3-4/cage avec des briquettes de bois à ronger et un nid en papier/cage. Les animaux seront observés régulièrement pour prévenir tout signe de mal-être.

7412 L'IL-22 est un médiateur soluble (ou cytokine) produit par certains lymphocytes, et agissant sur les cellules de nombreux tissus pour favoriser leur réparation suite à une agression. De par ses actions protectrices, l'IL-22 possède un rôle bénéfique dans de nombreuses maladies expérimentales, notamment la colite, l'hépatite ou la pancréatite. Des données récentes indiquent que l'IL-22 pourrait également avoir des actions bénéfiques dans le contrôle du développement de l'obésité. En effet, plusieurs études récentes ont montré un rôle bénéfique de l'administration d'IL-22 dans des modèles d'obésité chez la souris.

L'IL-22 possède un inhibiteur naturel, l'IL-22BP (pour IL-22 Binding Protein) qui, en l'empêchant de se fixer à son récepteur, peut gêner ses actions bénéfiques. Nous avons montré notamment que l'absence d'IL-22BP (chez des rats déficients pour l'IL-22BP) permettait de renforcer les actions protectrices de l'IL-22 dans un modèle de colite inflammatoire.

L'objectif de ce projet est de déterminer si l'IL-22BP gêne les actions bénéfiques de l'IL-22 dans le contrôle des réponses métaboliques. Pour cela, nous utiliserons des rats déficients pour l'IL-22BP, dans lesquels les actions de l'IL-22 ne sont plus freinées, et nous analyserons leur réponse à un modèle d'obésité induit par un régime riche en lipides.

Pour cette expérimentation animale, nous utiliserons au total 100 rats sur une durée de 3 ans. Il s'agit cependant d'une estimation haute puisque les objectifs du projet pourront être atteints avant ce terme. Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux retenu a été calculé afin de permettre une interprétation fiable des résultats (Réduire). En accord avec cette même règle, des mesures antalgiques seront mises en œuvre afin de limiter la souffrance des animaux (Raffiner). Enfin, l'utilisation d'un modèle animal est justifiée par l'absence de systèmes in vitro alternatifs permettant d'analyser la complexité des actions de l'IL-22 et de l'IL-22BP dans les réponses métaboliques (Remplace).

Ce projet s'insère dans le cadre de la formation pratique du Diplôme Universitaire d'Expérimentation Animale niveau Concepteur, proposé par l'Université. Chaque personne inscrite à cette formation (qui correspond à une obligation réglementaire) doit suivre un enseignement pratique. Dans ce contexte, notre établissement propose un stage de 4 demi-journées consécutives sur le thème de la

cancérologie expérimentale et des techniques d'expérimentations animales couramment mises en œuvre dans ce domaine.

Nous proposons d'organiser des sessions (entre 1 et 3 par année universitaire selon le nombre d'inscrits) de 4 stagiaires qui travailleront en binômes. Chaque stagiaire apprendra les gestes nécessaires à :

- * la préparation d'un modèle de greffe sous-cutanée de tumeur chez la souris immunodéprimée ;
- * l'administration de traitement anticancéreux (contention, injection intrapéritonéale, intraveineuse, gavage) ;
- * l'imagerie in vivo d'un animal (anesthésie, contention).

A travers cette expérience, les stagiaires mettront en pratique les connaissances théoriques concernant l'euthanasie (méthodes, contrôle, circuit d'élimination des cadavres, limitation du stress des congénères), le prélèvement d'organes, l'asepsie, l'anesthésie (méthodes, contrôle, durée,), le suivi post-opératoire (signes de douleur et de stress, méthodes d'analgésie), les points limites.

Le développement d'une tumeur ainsi que la réponse tumorale aux traitements sont des phénomènes très complexes qui ne peuvent pas être modélisés dans leur intégralité en utilisant méthodes alternatives (cultures cellulaires, modèles mathématiques). L'expérimentation animale en cancérologie préclinique est de facto incontournable, venant compléter des résultats acquis préalablement in vitro (Remplacement).

Pour chaque binôme, 4 souris seront nécessaires à cet apprentissage et le "formateur" aura besoin de 3 souris par session pour montrer les gestes. Au maximum, ce projet utilisera 165 souris sur 5 ans. Pour réduire le nombre d'animaux, nous implanterons 2 tumeurs / souris et nous adapterons le nombre en fonction du nombre d'inscrits (Réduction). Dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront mises en œuvre, les animaux seront anesthésiés (Raffinement).

7413 Le contexte clinique de notre projet concerne le traitement des tumeurs cérébrales, et plus particulièrement : comment améliorer les traitements par radiothérapie actuellement disponibles grâce à des nanoparticules métalliques.

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité de la radiothérapie quand elle est associée à des nanoparticules à base d'or et/ou d'oxyde de fer, qui sont capables d'amplifier localement les dégâts moléculaires et cellulaires causés par l'irradiation.

Les résultats de ce travail in vivo permettront de proposer des nouvelles modalités thérapeutiques adaptées aux tumeurs cérébrales.

Après avoir validé in vitro sur des modèles cellulaires simples l'intérêt de nos nanoparticules, il est nécessaire de caractériser et d'optimiser leur utilisation in vivo, avant de pouvoir proposer ces nouvelles stratégies de traitements en clinique humaine. Dans ce contexte, l'étude préclinique sera réalisée sur un modèle de souris porteuse de xénogreffes tumorales sous-cutanées. Le remplacement des expérimentations animales par des méthodes alternatives n'est pas possible puisque l'efficacité des thérapies anticancéreuses dépend, chez l'animal, de phénomènes complexes (inhérents à la physiopathologie cancéreuse d'une part, et, au comportement des nanoparticules en liquides biologiques d'autre part) qui ne peuvent pas être appréhendés dans leur globalité sur des modèles cellulaires in vitro. Cette étude préclinique nécessitera au maximum 140 animaux.

Chaque animal fera l'objet d'une greffe de cellules tumorales (sous forme de cellules pour l'étape 1 ou de fragments tumoraux pour les étapes ultérieures) qui donneront lieu au développement d'une tumeur. Parmi les souris ayant développé une tumeur, 96 seront traitées par radiothérapie (une seule dose de 10 Gy ou 5 doses de 2 Gy à raison d'une dose par jour, comme en clinique humaine) associée ou non à une injection intraveineuse de nanoparticules d'or et/ou d'oxyde de fer. 32 souris ne recevront que des nanoparticules et seront euthanasiées 2h ou 96h après injection afin d'évaluer la quantité de nanoparticules accumulées dans la tumeur et les organes.

Afin d'ajuster le nombre d'animaux, les expérimentations seront divisées en deux séries successives, avec une première série de 83 souris et une seconde série de 57 souris si les résultats de la première série sont encourageants (Réduire). De même, chaque fois que se sera possible, nous implanterons

deux tumeurs par souris. Enfin, 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), et euthanasiées dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement).

7414 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une étude dont l'objectif principal est de démontrer que le chrome intraérythrocytaire (dans les globules rouges) est un marqueur pertinent de l'exposition professionnelle au chrome hexavalent (Cr VI) qui est la forme la plus toxique du chrome. Les pathologies dues aux composés du Cr(VI) peuvent être sévères. Les expositions respiratoires chroniques peuvent notamment conduire à des asthmes, le contact cutané répété à des eczémas et l'exposition au Cr(VI) accroît également le risque de cancers bronchopulmonaires. Les utilisations les plus importantes pour les composés du Cr(VI) sont la fabrication de pigments, d'inhibiteurs de corrosion et la préservation du bois. On l'utilise également en grandes quantités pour concevoir de l'acier inoxydable ou des alliages spéciaux. L'exposition se fait donc principalement dans les industries manipulant des pigments ou des alliages à base de chrome.

En raison de la réduction rapide du Cr VI en chrome trivalent (Cr III) après absorption, les concentrations de chrome sanguin et urinaire reflètent la quantité totale de chrome absorbé. Elles ne sont cependant pas spécifiques des expositions au Cr VI car elles intègrent également les expositions au Cr III et au Cr O (chrome métal élémentaire). De plus, elles peuvent être le reflet de l'exposition récente mais également de l'exposition ancienne. Le dosage du chrome intraérythrocytaire serait spécifique de l'exposition au Cr VI ; des premiers essais in vitro (réalisés sur des poches de sang de donneurs) l'ont confirmé.

Avant de proposer ce dosage en routine sur le terrain (avec des salariés exposés au Cr VI), quelques manques subsistent ; en particulier les paramètres liés à la toxicocinétique du Cr doivent être (ré) évalués au préalable chez l'animal. Ces données complémentaires permettront de consolider les modèles de pharmacocinétique physiologique (PBPK) existants et leur utilisation pour l'extrapolation inter-espèces ainsi que l'évaluation de risque.

Au cours de ce projet, 51 rats males Sprague-Dawley de 8 semaines seront utilisés ; la plupart recevront une dose de Cr par injection intraveineuse afin de 1) explorer finement les cinétiques d'apparition et de disparition du Cr dans le sang et dans l'urine (expérience pilote) et 2) réaliser des courbes effet/dose pour le Cr intra-érythrocytaire ou urinaire. A la suite de l'injection de ces substances, les animaux seront surveillés quotidiennement pour le suivi de l'atteinte des points limites comprenant une perte de poids de 20% du poids corporel au cours des procédures, l'apparition de signes de souffrance (prostration, piloérection), de lésions cutanées ou de tumeurs.

L'utilisation des animaux sera réduite au strict nécessaire. Dans cette optique et pour pouvoir multiplier les temps de collecte de sang, certains animaux utilisés au cours de l'expérience pilote seront cathétérisés. Les investigations ne se limiteront pas au sang et à l'urine, différents tissus (cerveau, foie, rein, rate, poumon) seront également collectés à différents temps pour permettre l'apport de données relatives à la distribution du Cr dans l'organisme ainsi que des données de génotoxicité multi-organes (limitées chez le rat) au travers du test des comètes multi-organes.

Ce projet prend en compte la règle des 3R : Remplacement : il n'est pas possible de comprendre la toxicocinétique du Chrome chez l'homme sans réaliser d'extrapolation à partir de données issues d'un modèle in vivo. Réduction : le nombre d'animaux a été déterminé en fonction des recommandations internationales et afin de s'assurer de la robustesse des résultats. Raffinement : une attention particulière sera prise pour limiter l'inconfort des animaux lors des prélèvements de sang.

7415 Les acides gras de la famille des oméga-3 sont reconnus pour leur effet anti-cancéreux 2 avec pour acteurs principaux les acides gras eicosapentaénoïque (EPA) et docosahexaénoïque (DHA). Ces acides gras donnés sous forme de triglycérides (huile) ont la capacité de moduler la prolifération des cellules cancéreuses et de favoriser l'action de la réponse immunitaire anti-tumorale dans des modèles murins de carcinogenèse. Cependant, ces études pré-cliniques restent éloignées des études cliniques actuellement en cours utilisant ces acides gras sous forme libre et non sous forme de triglycérides dans le cadre du traitement du cancer colorectal. A partir du modèle de cancers coliques

développé chez les souris Balb-c et C57bl/6 par transplantation de cellules cancéreuses CT-26 ou MC-38, les objectifs de notre étude seront :

- d'évaluer et comparer l'effet anti-cancéreux de EPA et DHA sous forme libre en accord avec des études cliniques en cours - de confirmer in vivo les observations décrites in vitro sur les mécanismes moléculaires à l'origine de l'effet anti-cancéreux de ces acides gras sous leur forme libre.

Le modèle murin proposé mimera les études cliniques de phase II réalisées récemment et permettront d'analyser les interactions entre les cellules cancéreuses et les différentes composantes du système immunitaire empêchant le remplacement des souris par des modèles in vitro.

L'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses CT-26 et MC-38 permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées. Les souris avec les différentes tumeurs seront alors traitées par les acides gras et la progression tumorale sera analysée.

Pour répondre au volet raffinement, les souris soumises à la procédure expérimentale de transplantation de cellules cancéreuses seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu afin d'éviter le cannibalisme et du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni. De plus, les souris porteuses de tumeurs seront surveillées quotidiennement et euthanasiées avant l'apparition de souffrance.

Les souris seront réparties comme suit :

Traitement contrôle :

15 souris Balb-c avec tumeurs CT-26

15 souris C57bl/6 avec tumeurs MC-38

Traitement EPA :

15 souris Balb-c avec tumeurs CT-26

15 souris C57bl/6 avec tumeurs MC-38

Traitement DHA :

15 souris Balb-c avec tumeurs CT-26

15 souris C57bl/6 avec tumeurs MC-38

Soit au total, 90 souris pour une durée de projet d'un an.

Les troubles de prise de décision sociale et non sociale sont reportés dans pratiquement toutes les pathologies psychiatriques et de nombreuses pathologies neuro-dégénératives. Ils sont associés à de nombreux autres traits comportementaux individuels qui signalent un tableau clinique qu'il est difficile de modéliser chez l'animal dans son ensemble. Cependant, certains de ces troubles pourraient constituer des marqueurs de vulnérabilité ou de résilience de pathologies. Ainsi, repérer les traits comportementaux individuels associés aux troubles de la prise de décision est un élément majeur de la compréhension fondamentale de la pathologie sur le plan neurobiologique. Pour ce projet, nous utiliseront au total 1044 souris dont des souris normales ou transgéniques car nous disposons de souches et de lignées identifiées comme étant de très bons modèles de pathologies psychiatriques, notamment, la schizophrénie. Les objectifs scientifiques de ce projet, ne sont envisageables que chez l'animal, car ils nécessitent le contrôle de l'environnement complet de l'animal, depuis son développement jusqu'à l'âge adulte. Les fonctions hautement intégratives telles que la prise de décision, prise de risque, comportement social et impulsivité ne peuvent, bien entendu, pas être remplacées par des cultures cellulaires, des tranches de cerveaux ou des animaux invertébrés car les protocoles comportementaux n'existent pour la plupart pas et nécessitent l'existence d'un cortex préfrontal, structure cérébrale qui existe de façon homologue (projections neurochimiques identiques chez tous les mammifères, par exemple) chez la souris, notre modèle. Toutes les méthodes possibles sont utilisées pour limiter le nombre d'animaux et prendre en compte leur bien-être et leur potentielle souffrance. En particulier, pour les expériences pharmacologiques, nous organiserons les injections de façon intelligentes pour les animaux tout en ne provoquant pas d'interférence entre tâches comportementales et en conservant des nombres suffisants d'individus

pour des analyses statistiques pertinentes. Grâce à ce projet, nous nous attendons à identifier les déterminants individuels de la vulnérabilité ou de la résilience aux pathologies psychiatriques. Cela permettra d'aider à prédire l'apparition de ces pathologies psychiatriques chez les personnes humaines avec prédispositions.

7416 Projet pédagogique d'entraînement de la chirurgie laparoscopique dans la formation initiale des internes en chirurgie et des chirurgiens en formation continue dans les 4 spécialités intéressées par la chirurgie laparoscopique (= coeliochirurgie) : la chirurgie digestive, urologique, gynécologie-obstétrique et vasculaire.

Les indications de la chirurgie laparoscopique ont beaucoup augmenté et se sont largement répandues dans les disciplines chirurgicales pré-citées.

La laparoscopie est une technique qui consiste à opérer par l'intermédiaire de deux à cinq trocards (tubes creux), qui traversent la paroi abdominale, après avoir gonflé l'abdomen à l'aide d'un insufflateur de gaz CO₂. On introduit dans ces tubes des instruments adaptés ainsi qu'un tube optique relié à une caméra branchée sur un moniteur vidéo, permettant au chirurgien de visualiser et de contrôler ses gestes.

Par rapport à la laparotomie, « chirurgie en champ ouvert », la laparoscopie présente de nombreux avantages : elle est mini-invasive, générant des petites cicatrices, donc de meilleurs résultats esthétiques. Les suites post-opératoires sont généralement simples, les douleurs moindres. La durée du séjour à l'hôpital est plus courte et le retour au travail plus rapide.

Mais les techniques mini-invasives nécessitent un enseignement spécifique car elles peuvent être pourvoyeuses de morbidité sévère, voire de mortalité dans certains cas lorsqu'elles ne sont pas maîtrisées. Le risque principal étant la plaie de gros vaisseaux mais il peut y avoir d'autres risques comme les risques de plaies de voies biliaires, digestives ainsi que des blessures des voies urinaires. Pour pallier ces risques il est absolument nécessaire que le chirurgien s'entraîne via la formation sur animal vivant, le porc, avant d'opérer des patients. Le porc est l'animal de choix car il présente des similitudes anatomiques importantes avec l'humain au niveau de la cavité péritonéale. Il permet l'enseignement de la quasi-totalité des gestes chirurgicaux abdomino-pelviens.

Nous prévoyons d'organiser plusieurs cours de laparoscopie, les programmes ayant été définis par les responsables des différents collèges concernés par la discipline enseignée. Chaque enseignement pratique sera précédé d'un cours théorique. Les programmes seront adaptés au niveau de formation des étudiants et à la spécialité chirurgicale.

Avant toute formation sur l'animal vivant il est prévu l'utilisation de supports secs (pelvitainer, mousses, mannequins, organes d'animaux prélevés), puis l'utilisation de simulateurs électroniques et le sujet anatomique. A ce jour il n'existe pas de modèle suffisamment performant permettant de simuler l'apprentissage de la laparoscopie en condition réelle, l'entraînement sur le porc reste une étape indispensable si on veut recréer des conditions proches de la chirurgie chez l'homme et familiariser les chirurgiens à la dissection sur tissu vivant, ainsi qu'au contrôle de l'hémorragie.

Tous les animaux du projet subiront une anesthésie générale et une analgésie adaptée et seront euthanasiés par surdosage anesthésique à l'issue de chaque procédure.

Afin de limiter le nombre d'animaux tout en donnant des formations de qualité il est prévu des formations avec 4 apprenants/animal pour les cours généralistes et des formations avec 2 apprenants /animal pour les étudiants de spécialités et ayant déjà acquis les bases de la coeliochirurgie. Pour chaque poste (chaque animal) il y a un formateur, expert de la spécialité enseignée. Au total, nous avons évalué le nombre d'animaux à 760/5ans afin que les formations soient suivies par 372 apprenants/an. Le nombre d'animaux pourra être moins important si des nouveaux outils de formations (simulateurs) plus performants sont développés ou si le nombre d'apprenants diminue.

7417 Le cholestérol est essentiel à la mise en place des connexions du système nerveux central (SNC) et au maintien des capacités cognitives lors du vieillissement. Les neurones adultes n'importent pas le cholestérol de la circulation sanguine générale, mais des cellules gliales voisines qui produisent et libèrent ce stérol sous forme de lipoprotéines captées par les neurones via différents récepteurs.

Parmi eux, le Lipolysis Stimulated Receptor (LSR), récemment identifié dans le cerveau, jouerait un rôle clé dans le trafic intercellulaire de lipoprotéines et l'homéostasie du cholestérol cérébral.

En appui d'études in-vitro précédemment réalisées, l'identification des mécanismes d'action du LSR dans le cerveau et les liens possibles avec des pathologies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, passe par l'utilisation de modèles murins transgéniques dépourvus de LSR neuronal ou glial. Cette délétion ciblée sera induite chez des souris mâles adultes. Différents tests comportementaux seront mis en œuvre, afin d'évaluer les impacts de cette délétion sur l'activité (activimètre et open field), la coordination motrice (Wespoc test), la vision (reconnaissance d'objets), l'olfaction (enfouissement de la nourriture), l'anxiété (labyrinthe en croix surélevé), les mémoires sociale (chambre à 3 compartiments), à court et long terme (labyrinthes en Y et de Barnes). Les animaux seront testés à 2 reprises (3 et 9 mois d'âge). A terme, les animaux seront euthanasiés par surdose d'anesthésique gazeux, selon la réglementation en vigueur, et les tissus seront prélevés en vue d'analyses biochimiques et histologiques.

Pour chaque délétion ciblée, 44 souris transgéniques et 15 souris C57BL/6J (lot témoin) seront nécessaires ; 20 souris C57BL/6J seront ajoutées pour la quantification des effets anxiolytiques (traitement diazépam) et mnésiques (traitement scopolamine). Pour les deux délétions envisagées, un total de 158 souris est donc nécessaire à la réalisation de cette étude.

Cette étude se veut en accord avec la règle des 3R.

Remplacement : Il n'existe pas d'alternative in-vitro permettant de modéliser le fonctionnement complexe du SNC. Cependant, grâce à des études sur cultures primaires purifiées issues de diverses zones cérébrales, il a pu être établi une cartographie de l'expression de LSR dans le SNC et une expression neuronale et gliale mise en évidence.

Réduction : Le nombre d'animaux nécessaire par groupe expérimental testé (22 souris maximum par groupe) a été défini pour obtenir une puissance statistique satisfaisante.

Raffinement : La mutation sélective du gène LSR, dans les neurones ou les glies de souris adultes, permet de limiter le risque de mortalité et de souffrance (un seul type cellulaire affecté, pas de malformations embryonnaires graves). Nous espérons ainsi identifier un phénotype précis au niveau cérébral, sans induire de pathologies invalidantes annexes (dyslipidémie, athérosclérose).

Durant cette étude, les animaux seront hébergés dans des conditions visant à optimiser leur bien-être au quotidien, dans un environnement enrichi. En cas d'atteinte des points limites définis (atteinte cérébrale massive constituant une souffrance importante (épilepsie, hémorragie), hypothermie, diarrhée, perte de poids > 10%...), l'expérimentation sera stoppée et les animaux rapidement euthanasiés. La mort sera vérifiée par absence de battement cardiaque puis dislocation cervicale.

Les tests comportementaux sont sélectionnés pour leur capacité à fournir le maximum d'information en un minimum de manipulation, tout en étant le moins anxiogène possible. Toutes les procédures seront effectuées dans l'animalerie, par un personnel qualifié et dans un environnement familier et sécurisant pour l'animal.

7418 Le cancer de la prostate est la 2e cause de mortalité masculine par cancer en Amérique du Nord, après le cancer du poumon. Dans l'Union Européenne, environ 2.3 millions de nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en 2006 et plus de 1.1 millions de décès par cancer ont été enregistrés. Chez l'homme, le cancer de la prostate est le plus fréquent (301 500 nouveaux cas, 24.1% de l'ensemble des cancers), avant le cancer du poumon et le cancer colorectal. Le cancer de la prostate représente la troisième cause de décès par cancer (67 800 décès, 10.4 % de l'ensemble des décès par cancer), après le cancer du poumon (171 900 décès) et le cancer colorectal (74 500 décès). Le traitement du cancer de la prostate représente donc un problème majeur de santé publique. Le PSMA (prostate-specific membrane antigen) est un biomarqueur spécifique du cancer de la prostate utilisé pour le développement de nouveaux composés thérapeutiques. L'objectif de ce projet est la détermination de la biodistribution et de l'efficacité thérapeutique d'un nouveau médicament ciblant le PSMA. Ce médicament est couplé à un isotope radioactif (le Lutétium-177) qui va permettre de détruire les cellules cancéreuses par radiothérapie. Dans l'objectif du transfert clinique de cette molécule il est indispensable d'évaluer la biodistribution et l'efficacité de cette molécule.

1) Biodistribution : elle sera évaluée afin de s'assurer que la molécule testée s'accumule dans les cellules tumorales mais pas dans le tissu sain. Ceci sera réalisé en injectant de faibles doses non thérapeutiques la molécule à évaluer chez des souris immunodéficientes chez lesquelles seront implantées en sous-cutané des lignées tumorales humaines exprimant ou non le PSMA (La biodistribution sera évaluée à 7 temps et nécessite 6 souris par temps, soit un total de 42 animaux).

2) Thérapie. D'autre part, il faudra également évaluer l'efficacité de la thérapie. Ceci sera réalisé en testant deux doses potentiellement thérapeutiques de la molécule à évaluer chez des souris immunodéficientes chez lesquelles seront implantées en sous-cutané des lignées tumorales humaines exprimant le PSMA. Un suivi permettra d'évaluer l'effet de ces traitements sur le volume de la tumeur en comparaison de celui observé chez le groupe contrôle non traité (12 souris / dose x 2 doses et un groupe contrôle, soit 36 souris au total).

L'étude comprendra donc au total 78 animaux. Tout sera mis en œuvre pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : La molécule a été préalablement validée in vitro ; les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; des points limite adaptés seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance (dont un volume tumoral maximum) ; un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé ; enfin, le nombre minimum de mesures et d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé.

7419 Dans la moelle osseuse est fabriquée une cellule dite « souche hématopoïétique ». Cette cellule possède la capacité de donner naissance et d'assurer un renouvellement régulier des différentes cellules constituant le sang. Parmi ces cellules l'on retrouve les cellules dites spécialisées, les globules blancs. Ces derniers patrouillent le sang, les organes lymphoïdes et les tissus en jouant un rôle prépondérant dans la protection de l'organisme en empêchant l'entrée et la propagation d'agents pathogènes ou encore l'apparition de cellules cancéreuses, en maintenant une surveillance accrue. Malheureusement dans certaines pathologies du sang, les cellules « souches hématopoïétiques » ou encore les globules blancs n'ont plus la capacité d'exercer pleinement leurs fonctions ceci dû à des défauts affectant leur processus normal de maturation ou la reconnaissance des cellules cancéreuses et infectées. Ces désordres sont souvent à l'origine de maladie auto-immunes et de cancers hématologiques.

OBJECTIF : Il est nécessaire de pouvoir cibler les cellules « souches hématopoïétiques » ou encore les globules blancs chez le patient afin de les corriger sans nuire aux autres cellules environnantes par exemple en permettant l'expression d'un gène médicament (rétablir la sécrétion de facteurs de coagulation...) ou encore en améliorant les fonctions des globules blancs (permettre une reconnaissance beaucoup plus spécifique des cellules cancéreuses et infectées...).

METHODE : A l'aide de modèle murins adaptés dans lesquels nous reproduirons le système immunitaire humain, nous évaluerons la capacité de nos outils de transfert d'ADN à cibler et modifier spécifiquement les cellules « souches hématopoïétiques » et les globules blancs.

BENEFICE : Ce projet permettra d'obtenir de nombreuses informations sur le devenir des cellules modifiées in vivo ainsi que la spécificité et la stabilité de la modification génétique générée, ce qui ouvrira des voies à la mise en place de nouvelles stratégies thérapeutiques adaptées aux maladies et cancers affectant le système hématopoïétique.

Conformément aux exigences de remplacement (R1), réduction (R2) et raffinement (R3), les expériences in vivo sont précédées de multiples expériences in vitro mises en place au laboratoire ce qui permettra de n'utiliser que le nombre de souris strictement nécessaire. De plus, en l'absence de méthodes alternatives ex vivo ou in vitro pour suivre le devenir et l'activité fonctionnelle des cellules « souches hématopoïétiques » ou des globules blancs humains après modification génétique in vivo, l'expérimentation animale reste à l'heure actuelle la seule solution pour mener à bien ce projet. Toute douleur, souffrance, angoisse pouvant être ressenties par l'animal seront limitées par l'application des points limites précises et adaptées, et un suivi adapté des animaux.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1740 souris afin d'obtenir un nombre suffisant de résultats pour que cela soient scientifiquement acceptable.

7420 Le myélome multiple est un cancer caractérisé par la présence et la multiplication de plasmocytes dits « anormaux » dans la moelle osseuse. Les plasmocytes, dont le rôle est de produire des anticorps (appelés également immunoglobulines), sont impliqués dans l'immunité et ont pour but de lutter contre les infections. Les conséquences de cette prolifération anarchique de plasmocytes anormaux sont multiples et les symptômes les plus fréquents sont des douleurs osseuses résultant de lésions en certains endroits du squelette.

Différentes méthodes de traitement sont actuellement proposées (chimiothérapie, radiothérapie, médicaments ciblés, corticostéroïdes...). Néanmoins et quel que soit le traitement indiqué, le myélome multiple reste irrémédiablement incurable et fatal. Parmi les stratégies thérapeutiques actuelles, la prescription d'un inhibiteur du protéasome, est l'une des plus prometteuses. Son association à d'autres thérapies, est une alternative aux mécanismes de résistance s'installant lors de traitements tumoraux et à l'administration de doses élevées entraînant souvent des effets indésirables.

Ce projet a pour but d'établir une nouvelle thérapie du myélome multiple dans un modèle murin développant cette pathologie, en combinant les effets de 2 drogues.

De récentes études ont permis d'établir un modèle murin de myélome multiple présentant les majeures caractéristiques de la pathologie humaine (notamment une présence de lésions osseuses et une compression de la moelle épinière). Ce modèle a été réalisé par injection de cellules tumorales de myélome multiple dans des souris.

Nous allons reproduire ce modèle et réaliser quatre groupes de souris qui subiront différents traitements administrés par voie intrapéritonéale.

Comme cela a été récemment publié dans la littérature, ces cellules ont la particularité d'être compatibles à la culture cellulaire in vitro. Par conséquent et par souci de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, les concentrations de drogues à tester pourront être établies in vitro.

Afin de se familiariser avec les signes et les symptômes attendus, une étude pilote permettra de confirmer les points limites ainsi que de valider les doses d'inhibiteurs administrés seuls, pour lesquelles nous nous attendons à un effet insuffisant sur le traitement du myélome, en comparaison à l'efficacité du traitement combiné. Cela permettra de réduire le nombre total d'animaux nécessaires à la réalisation de ce projet qui est estimé à 120 souris.

L'état général des animaux sera évalué quotidiennement après injection des cellules tumorales et en cas de souffrance ou de signes anormaux, les souris seront immédiatement euthanasiées.

A l'issue de cette étude, nous nous attendons à observer un ralentissement de la progression tumorale et une amélioration de la durée de survie des animaux ayant suivi un traitement combiné, en comparaison avec ceux ayant suivi un traitement unique.

7421 Notre projet cherchera à définir le rôle de l'immunité adaptative, et plus particulièrement des lymphocytes T, dans la réparation du cœur après un infarctus du myocarde. Pour cela, nous évaluerons le rôle de différentes populations de lymphocytes T dans des modèles d'atteinte cardiaque chez la souris.

Malgré l'amélioration de la prise en charge chirurgicale et médicamenteuse des patients souffrant d'un infarctus du myocarde, les conséquences à plus long terme de l'infarctus sur la fonction du cœur demeurent considérables et la mortalité reste élevée chez ces patients. La compréhension des mécanismes limitant ou favorisant l'atteinte cardiaque constitue donc un enjeu thérapeutique et sociétal majeur.

Les modèles cellulaires ne pouvant refléter la complexité de la pathologie humaine et des interactions cellulaires sous-tendant la réparation cardiaque, la souris est le meilleur modèle animal permettant d'étudier le processus inflammatoire associé à l'infarctus du myocarde. De plus, l'utilisation de souris modifiées génétiquement nous permettra d'appréhender le rôle spécifique de certaines populations de lymphocytes T. Les souris subiront un infarctus du myocarde ou une ablation d'une fraction du cœur et l'analyse consistera à étudier le nombre et le type de cellules inflammatoires infiltrant le cœur, et surtout le rôle spécifique de sous populations de lymphocytes T sur les modifications du tissu cardiaque (analyse immunohistologique de la taille et de la composition de la zone lésée), la régénération des cellules contractiles du cœur (utilisation de marqueurs spécifiques sur des coupes

de tissu cardiaque) et la fonction cardiaque (évaluée par échocardiographie). Ce projet se déroulera sur 4 ans et nécessitera au total 720 souris. Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et définies afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en nous permettant d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. De plus des paramètres expérimentaux tels que le nombre d'animaux ou bien encore les durées de traitements ont déjà été déterminés par d'autres projets nous permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Nous diminuerons au maximum la souffrance des animaux, toutes les procédures se feront sous anesthésie générale et des traitements antalgiques sont prévus. Nous avons établi une grille d'évaluation des points limites, si ces paramètres sont atteints, une euthanasie anticipée des animaux sera réalisée.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre les mécanismes initiés par la réaction inflammatoire associée à l'infarctus du myocarde. Ces résultats pourraient conduire au développement de nouvelles approches thérapeutiques ciblant l'immunité adaptative chez les patients présentant des pathologies ischémiques cardiaques.

1. Objectif du projet

TLR3 est un récepteur de l'immunité innée, exprimé par des cellules immunitaires et épithéliales. Dans les cellules cancéreuses qui expriment toujours le récepteur (cancer du sein, poumon,), l'activation du récepteur entraîne à la fois une inflammation mais aussi la mort de ces cellules cancéreuses et un ralentissement de la croissance tumorale. La possibilité de ciblage thérapeutique de TLR3 dans les cancers a été confirmée par une étude rétrospective démontrant que seules les patientes dont le cancer du sein exprimait TLR3 avaient répondu favorablement à un traitement avec un ligand de TLR3.

Malgré leur activité adjuvante en vaccination, aucune molécule cible de TLR3 n'a à ce jour obtenu l'autorisation de mise sur le marché, en raison d'effets toxiques ou de manque d'efficacité, et d'homogénéité structurelle.

Récemment, un ligand de TLR3, parfaitement défini structurellement et donc reproductible a été mis au point. La preuve de concept in vitro de l'effet pro-apoptotique de cette molécule sur des cellules tumorales a été apporté in vitro.

De façon très intéressante, les cellules traitées par le ligand de TLR3 présentent des marqueurs permettant de prédire une activation du système immunitaire. Ceci est une observation très importante aux vues des récentes avancées en immunothérapie, et permettrait d'envisager un traitement combinant le ligand de Toll3 avec les inhibiteurs des points de contrôle de l'immunité.

Le but de ce projet est de prouver l'efficacité de ce ligand dans un modèle syngénique d'hépatocarcinome.

2. Conformité aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement.

La règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée; Réduction du nombre d'animaux sans mettre en péril une interprétation statistique des résultats. Une définition précises des points limites et une surveillance adaptée des animaux permettra d'éviter la souffrance des animaux. Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles, le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal. Seul un modèle in vivo nous permettra d'étudier l'effet de cette molécule sur la croissance de cellules tumorales.

3. Nombre total d'animaux inclus dans le projet

Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 240 souris

7422 L'atteinte rectale des maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), et particulièrement la rectite isolée de rectocolite hémorragique (RCH), a une prévalence de 44 à 60%. Dix pourcent des rectites pures sont réfractaires aux thérapeutiques usuelles. En pratique courante, les traitements utilisés pour les rectites réfractaires avec une efficacité histologique mal connue et des effets secondaires potentiellement graves. Bien que complexe et multifactorielle, la physiopathologie l'inflammation muqueuse de la RCH est la résultante d'une interaction trop étroite entre le microbiote (ensemble des bactéries de la lumière intestinale) et les cellules épithéliales. Il est démontré que cette étroite interaction est la conséquence d'une altération de la barrière de mucus (sécrétion imperméable aux bactéries tapissant la muqueuse). Dans la RCH, la sécrétion de mucus est altérée. En situation

physiologique, la barrière de Mucus est composée de mucine qui est une glycoprotéine. La synthèse ex vivo de Mucine est techniquement et financièrement très complexe.

L'objectif de notre travail est d'évaluer différentes molécules de sucres employés comme mucus de synthèse et vecteur d'effecteurs pharmacologiques directement sur la muqueuse lésée. Parmi les molécules, connues et d'utilisation médicale reconnue, le dextrane, le pullulane et l'acide hyaluronique seront évalués. L'acide hyaluronique, est un élément essentiel à la structuration tissulaire. Il joue un rôle majeur dans la cicatrisation et exerce des effets protecteurs anti-inflammatoires. Le dextrane et le pullulane sont deux polymères de polysaccharides, peu coûteux dont les capacités à créer un hydrogel imperméable sont reconnues et déjà utilisés dans d'autres applications médicales. Utilisé sous forme de gel, ces molécules constituent des matériaux de choix la délivrance d'effecteurs pharmacologiques.

Cette approche thérapeutique comblerait un manque dans l'arsenal thérapeutique actuel, avec un risque réduit d'effets secondaires. Notre travail se fera en deux étapes, la première concernant la sélection du meilleur composé en l'évaluant seul comme traitement d'une colite. Ces molécules seront instillées par lavements quotidiens successifs pendant 5 jours (J1-J5). L'efficacité thérapeutique sera évaluée par un examen au microscope du colon pour évaluer la capacité de protection du gel. Une fois ce polymère sélectionné déterminera sa dose la plus efficace, puis nous évaluerons l'efficacité d'un gel couplé à un médicament reconnu dans le traitement de la rectite. Nous étudierons également les marqueurs de l'inflammation dans le sang et la paroi du colon pour identifier un effet de notre gel.

Notre étude portera sur le traitement de souris sauvages, chez lesquelles une rectite sera induite selon deux modèles reconnus (Chimique, Radique). Aucun modèle *in silico* (se passant de l'expérimentation animale) ne peut rendre compte de la complexité de l'interaction hôte/bactérie intestinales. Les groupes thérapeutiques seront de 6 souris (nombre le plus restreint permettant d'avoir une représentativité). Nous testerons 3 traitements (Acide Hyaluronique, pullulane et Dextran) et un groupe contrôle. Nous étudierons deux modèles de colites induites (Chimique et Radique) (deux causes majeures de rectites chez l'homme, de mécanismes différents, donc modèles complémentaires). Nous déterminerons par étapes successives la dose la plus efficace au moyen de critères de jugements multiples sur les mêmes manipulations. Nous procéderons à des anesthésies générales ainsi qu'à des antalgiques si cela est nécessaire. Enfin en cas de perte de poids de 20% ou de changement de comportement signifiant un inconfort de la souris, la manipulation sera écourtée et l'animal euthanasié. 102 souris sont estimées nécessaires pour obtenir des résultats scientifiquement acceptables.

7423 1-Objectif scientifique du projet

Le pancréas est un organe mixte assurant une fonction exocrine impliquée dans la digestion et une fonction endocrine impliquée dans le métabolisme du glucose. La grande majorité des tumeurs pancréatiques (~80%) est représentée par des adénocarcinomes. Aucun traitement disponible à ce jour ne parvient à éradiquer la maladie (le taux de survie à 5 ans n'est que de 5%). Pourtant l'adénocarcinome du pancréas (ADKP) est estimé comme la 2^e cause de mort par le cancer d'ici 2020.

L'ADKP est caractérisé par un stroma dense créant une barrière aux traitements. Ce stroma est très riche en Transforming Growth Factor Beta (TGF β), connu pour ses effets oncogéniques sur les cellules tumorales et sur les cellules du microenvironnement. Les tumeurs sont particulièrement sensibles à cette cytokine, dont la concentration locale augmente avec le stade et le grade de nombreuses tumeurs, favorisant ainsi l'invasion locale et la dissémination métastatique par des mécanismes variés.

Le TGF β est donc une cible thérapeutique intéressante dans le cancer du pancréas, cependant son mécanisme d'action au cours des différentes étapes de la carcinogénèse pancréatique est mal connu. Dans ces conditions l'essai de molécules thérapeutiques visant à cibler le TGF β est difficile à mettre en place. Il est donc crucial d'élucider son rôle sur les différents compartiments cellulaires qui composent une tumeur, ainsi que leur interaction fonctionnelle.

Ainsi notre objectif est de caractériser l'effet d'une production de TGF bioactif dans le stroma sur la carcinogénèse pancréatique chez l'animal adulte.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

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

La moitié des patients décède moins de six mois après le diagnostic.

La caractérisation de nouveaux mécanismes pro-tumoraux ainsi que le développement de nouveaux modèles mimant au mieux ce qui est observé en clinique est essentiel pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques contre le cancer du pancréas et représente donc un réel enjeu clinique pour les années à venir.

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

Seul un organisme entier peut nous permettre d'étudier in vivo des interactions complexes entre différents compartiments biologiques à savoir l'effet du TGF β sur le développement des lésions précancéreuses pancréatiques autochtones.

Le modèle murin que nous avons choisi pour réaliser cette étude reproduit parfaitement la pathologie humaine (mutation touchant 90% des patients et stroma riche en TGF β) ce qui en fait un modèle de choix.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Deux facteurs objectifs seront pris en compte afin de déterminer l'évolution de l'ADKP : 1) Le nombre de lésions précancéreuses par unité de surface de pancréas; 2) Les proportions des lésions de chaque grade.

A l'instar de ce qui est observé chez l'Homme, les lésions précancéreuses pancréatiques, se développant chez les souris génétiquement modifiées, sont microscopiques et asymptomatiques. Toutefois, une attention particulière sera apportée à l'éventuelle apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance animale et des points limites appropriés seront mis en place.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Au total, 150 souris seront utilisées.

7424 Objectif scientifique du projet

Au cours du processus de transformation et tout au long de sa vie, la cellule cancéreuse produit des signaux qui sont précisément contrôlés dans les conditions normales. Certains de ces signaux dépendent d'interactions entre les protéines à l'intérieur de la cellule. Nous avons identifié des molécules qui bloquent les interactions d'une protéine clé avec ses partenaires, induisant ainsi la mort de la cellule cancéreuse. Nous avons démontré l'efficacité d'une de ces molécules sur la croissance tumorale. Suite à cette preuve de concept, la molécule et sa formulation ont été retravaillées pour obtenir une molécule administrable par voie orale. Le but de ce protocole est d'évaluer l'efficacité, la biodistribution et déterminer un schéma d'administration pour cette molécule délivrée par voie orale.

Nous allons respecter la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer); Réduction : le nombre de souris sera réduit à minima pour permettre une analyse statistique, Raffinement : Lors de la réalisation des protocoles le maximum d'informations sera récolté afin de restreindre l'utilisation de l'animal, le modèle est bien connu et des points limites ont été établis pour permettre un suivi rigoureux des animaux. Remplacement : des méthodes alternatives sont utilisées lorsqu'elles sont disponibles. Le nombre de souris total pour les 3 procédures est : 175

7425 OBJECTIF :

L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus et d'explorer in fine de nouvelles pistes thérapeutiques. Pour cela, nous avons donc développé un modèle murin d'ischémie-reperfusion, largement éprouvé dans la littérature, permettant de reproduire au mieux cette pathologie et ainsi de l'étudier. Cependant, en conséquence du retrait sur le marché d'un anesthésique couramment utilisé dans ce modèle, il devient impératif de trouver un nouveau protocole anesthésique adapté à l'activité des équipes de recherche. Une précédente étude portant sur plusieurs protocoles anesthésiques nous a permis de dégager plusieurs pistes

potentielles. Depuis, la consultation des différents chefs de projets du laboratoire et de plusieurs vétérinaires, notamment anesthésistes, nous a permis d'optimiser 2 protocoles anesthésiques prometteurs. L'objectif est donc ici de valider l'adéquation entre la durée/profondeur de l'anesthésie (décrites par ailleurs dans la littérature) et l'acte chirurgical réalisé au laboratoire (ischémie-reperfusion cardiaque). De plus il sera vérifié l'absence d'interférence majeure entre les substances anesthésiques/analgésiques utilisées et les objectifs scientifiques des projets d'ischémie-reperfusion du laboratoire

DESCRIPTIF :

Le projet se divisera en trois parties :

-Une première procédure permettra tout d'abord de tester et déterminer les caractéristiques du plus prometteur des deux protocoles anesthésiques. L'efficacité de ce protocole sera donc évaluée tant sur la profondeur de l'anesthésie que sur la durée, ou encore la vitesse d'induction et de réveil. L'entretien de cette anesthésie sera réalisé, au besoin, pour s'assurer que la durée totale du stade chirurgical (=anesthésie profonde) est suffisante pour pratiquer l'acte chirurgical de manière confortable et sans risque pour l'animal. Un score sera utilisé pour estimer la profondeur de l'anesthésie. En outre, un électrocardiogramme, la fréquence respiratoire, la température corporelle, la pression non invasive et des mesures de saturation en oxygène seront enregistrés pour déterminer l'impact des différents protocoles sur les paramètres hémodynamiques. Il s'agit d'une procédure très peu invasive puisqu'elle consiste à anesthésier les animaux (injection des substances au niveau de l'abdomen ou sous la peau : piqûres d'aiguille), suivre les paramètres précédemment cités puis surveiller le réveil (avec remise en cage après récupération complète de l'animal).

-Une seconde procédure consiste à évaluer, dans les mêmes conditions et avec les mêmes paramètres, le second protocole anesthésique. Cependant, cette procédure ne sera engagée que si les résultats de la première procédure ne donnent pas de résultats satisfaisants. Si cette deuxième procédure fournit des résultats non satisfaisants, le projet prendra fin ici.

-Enfin, une troisième procédure consiste à mettre en œuvre le protocole anesthésique retenu (selon les résultats des précédentes procédures) dans un contexte réel de chirurgie cardiaque, telle que réalisée au laboratoire lors d'essais pré-cliniques. Les paramètres de profondeur d'anesthésie et les paramètres hémodynamiques mesurés seront les mêmes que dans les procédures précédentes (excepté : du fait de la mise sous respiration assistée des animaux, la fréquence respiratoire "naturelle" des animaux ne sera plus évaluée mais le CO₂ expiré sera mesuré). Vingt-quatre heures après la chirurgie, les animaux sont de nouveau anesthésiés pour permettre le prélèvement cardiaque (pas de réveil). Le prélèvement (puis conservation) d'autres tissus que le cœur est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements (réduction). Contrairement aux deux précédentes procédures, cette troisième procédure implique cette fois-ci une chirurgie lourde, sous anesthésie générale. La chirurgie consiste à mettre l'animal sous respirateur, ouvrir le thorax afin de réaliser la séquence d'ischémie puis la reperfusion, effectuer la suture des plaies et surveiller le réveil de l'animal. Néanmoins, cet acte chirurgical est parfaitement maîtrisé au laboratoire et fait l'objet d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire adaptés.

REGLE DES 3R :

Des tests statistiques ont permis de déterminer l'effectif minimal d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats fiables. Au maximum, ce sont donc 54 souris C57bl/6J âgées de 30 à 35 semaines au moment de l'expérimentation qui participeront à cette étude, toutes procédures confondues. Ces animaux proviennent d'une précédente étude non invasive (réduction). Les deux premières procédures du présent projet étant non invasives, les animaux concernés seront donc maintenus en vie, sauf contre-indication vétérinaire, pour participer à une étude pédagogique sans réveil ultérieure (réduction). La troisième procédure consiste en une chirurgie lourde et fait donc l'objet d'une couverture analgésique adaptée (morphinique et anesthésique local sont adjoints au protocole anesthésique) et d'une surveillance et d'un suivi particuliers du réveil à la mort de l'animal (raffinement). De plus, cette chirurgie est pratiquée depuis de nombreuses années au laboratoire, offrant ainsi un recul et un retour d'expérience très important, notamment en terme de suivi post-opératoire, avec un réveil en couveuse dont l'air est enrichi en oxygène (raffinement). Ceci permet ici une surveillance adaptée de l'animal dès son réveil (fiche d'observation spécifique à cette chirurgie),

la réduction des complications (rares) leur rapide détection et prise en charge, ou encore l'apport d'alimentation et de boisson sous forme gélifiée.

7426 L'autisme est caractérisé par une communication sociale atypique, ainsi que des comportements stéréotypés et des intérêts restreints. Cette maladie, extrêmement répandue, touche une personne sur 100. Des gènes associés à l'autisme codent principalement des protéines à la synapse, c'est-à-dire aux points de contacts entre les neurones. Nous nous attachons à comprendre les mécanismes moléculaires à la base des comportements atypiques observés chez les personnes avec autisme. Les marqueurs de l'autisme sont donc principalement comportementaux en l'état actuel des connaissances, ce qui implique que l'étude des mécanismes de l'autisme ne peut se faire que sur l'animal vivant. Nous étudions donc le comportement de souris invalidées pour les gènes identifiés au laboratoire, que nous comparons à d'autres lignées de souris témoins au sein du présent projet « Génération et caractérisation phénotypique de nouveaux modèles murins de l'autisme ». Notre objectif est de déterminer les mécanismes associés aux déficits comportementaux présents dans l'autisme. Ce projet est un projet de recherche fondamentale, et a pour vocation de faciliter la compréhension des mécanismes de l'autisme. Nous souhaitons identifier des modèles murins portant des mutations hétérozygotes associées à l'autisme, pour comprendre le rôle de gènes modulateurs. De tels modèles robustes à l'état hétérozygote font actuellement défaut et pourtant ils représentent la base pour des essais de traitements.

Nous choisirons la souris comme espèce pouvant être manipulée génétiquement et dont le comportement est suffisamment connu pour être étudié en tant que modèle de l'autisme. Nous nous concentrerons principalement sur les anomalies de la communication sociale, tout en contrôlant les autres comportements tels que la locomotion, l'anxiété, les perceptions sensorielles et les comportements stéréotypés. Les animaux seront suivis en permanence. Les caractérisations comportementales seront réalisées dans de grands environnements d'hébergement, avec une intervention minimale des expérimentateurs. Sur la totalité du projet, nous prévoyons d'utiliser 1504 souris mâles et femelles sur 5 ans. Les animaux seront testés à tous âges (souriceaux, juvéniles et adultes). Nous nous efforcerons de réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés en ajustant au mieux les protocoles expérimentaux et les analyses statistiques pour obtenir des résultats statistiques robustes tout en tenant compte de la variabilité inter-individuelle des animaux testés. Les expériences comportementales réalisées dans les procédures 1 (736 souris), 2 (384 souris) et 3 (384 souris) ne sont pas considérées comme invasives et n'engendreront qu'un stress limité et très ponctuel. Ces procédures sont donc considérées comme légères. Les animaux seront hébergés en groupes stables, pour respecter leur vie sociale. Aucun des tests n'engendrera de conséquences durables sur les animaux. Les animaux seront suivis quotidiennement pour détecter immédiatement des signes cliniques (perte de poids, fourrure abîmée) et comportementaux (prostration, agitation) de mal-être. Les animaux seront alors sortis de la procédure et traités ou mis à mort.

Dans le cadre du changement de législation, une mise en conformité a dû être appliquée. Celle-ci a consisté à développer des cages pour hébergement des Primates Non Humains (PNH) en animalerie confinée. Le but de ce projet est de tester et d'apprécier :

- Le bien-être animal
- La manipulation des cages dans le respect des règles de biosécurité
- Se familiariser avec la manipulation des cages

Chaque personnel de l'équipe animalerie participera afin de pouvoir utiliser les cages hébergeant des animaux. Les procédures de travail seront ainsi éprouvées. Ce projet comporte une procédure qui sera répétée deux fois. En effet, les deux zones d'hébergement ayant des surfaces différemment organisées, les cages sont également différentes en longueur et profondeur et par conséquent, le test doit être réalisé pour chaque cage/zone d'hébergement.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le nombre minimal d'animaux sera utilisés afin de permettre à chaque personnel de tester la cage deux fois. Ces animaux retourneront ensuite chez l'éleveur. Un enrichissement de stimulation et alimentaire seront systématiquement utilisés.

Ce projet comportera une procédure répétée deux fois (réalisées dans deux zones d'hébergement différentes) incluant 3 Macaques cynomolgus (nombre maximale d'animaux pouvant être hébergés dans une cage) chacune soit 6 animaux au total.

7427 Les calcifications vasculaires sont des accumulations de calcium au niveau des vaisseaux; ce phénomène pathologique est caractéristique des stades tardifs du développement de l'athérosclérose et sont prédictifs d'événements cardiovasculaires. L'étendue et la sévérité des calcifications sont reconnues comme des facteurs de risque majeurs, prédictifs de morbidité et de mortalité cardiovasculaires. Les calcifications vasculaires sont retrouvées dans la population générale, associées au vieillissement, mais leur développement est accéléré au cours de différentes maladies telles que le diabète, les pathologies inflammatoires, et l'insuffisance rénale chronique (IRC).

La meilleure connaissance des phénomènes physiopathologiques responsables de la minéralisation vasculaire permettrait d'identifier des nouveaux marqueurs biologiques de calcifications vasculaires et de sélectionner des molécules d'intérêt pour leur prévention ou traitement.

De nombreuses observations cliniques ont montré qu'une hypervitaminose en Vitamine D3 induit l'apparition des calcifications vasculaires chez l'Homme. Nous avons donc choisi de développer un modèle pathologique induit par des doses élevées de Vitamine D3 et un régime supplémenté en phosphore chez le rat, de façon similaire aux données disponibles en littérature. L'objectif de cette étude est d'évaluer en parallèle l'effet de molécules de référence et de candidats médicaments sur ce modèle de calcifications vasculaires. Actuellement, les méthodes alternatives autres que l'expérimentation in vivo permettant une telle évaluation sont inexistantes. De ce fait, ce déficit rend incontournable le recours à l'expérimentation animale.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement (tunnels en polycarbonate, aspen brick) sera introduit. Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 1264 rats à raison de 8 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), de 6 groupes par étude et de 26 études au total (5 études planifiées par an + 1 étude pilote pour la mise au point du modèle). Au cours des expérimentations les animaux seront soumis à des prélèvements sanguins et des récoltes urinaires à différents temps. Ces prélèvements permettront de mesurer des biomarqueurs d'intérêt pour cette pathologie et/ou d'en identifier de nouveaux pouvant ainsi prédire son évolution. L'utilisation de cages à métabolisme pour les récoltes urinaires nous permettra de mesurer la fonction rénale par estimation de la clairance de la créatinine et de l'urée endogène sans recours à l'euthanasie des animaux à différents temps. Notre stratégie permettra donc de réduire sensiblement le nombre d'animaux par groupe et de réaliser ce projet selon la règle des 3-R.

L'asthme est une maladie chronique d'origine souvent immunologique et présentant différents phénotypes et réponses aux traitements. Dans les cas les plus sévères, l'asthme peut entraîner des symptômes respiratoires importants qui peuvent être mal contrôlés par les traitements disponibles comme les corticoïdes. L'asthme est caractérisé par une inflammation et un remodelage des voies aériennes et par une hyper-réactivité bronchique, autant d'événements responsables d'anomalies fonctionnelles respiratoires. L'asthme touche 300 millions de personnes dans le monde. L'objectif 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. Nous avons découvert un facteur clé de l'immunité et de l'inflammation. Pour mieux appréhender son rôle in vivo, nous avons généré des souris déficientes pour l'expression de ce facteur clé. Ces souris présentent un déficit immunitaire important. Des données préliminaires suggèrent que cette protéine pourrait être aussi impliquée dans l'inflammation des voies aériennes supérieures responsable de pathologies telles que l'asthme. Pour étudier la contribution de la protéine que nous étudions dans l'asthme, nous procéderons à l'administration intra-nasale d'ovalbumine à des souris déficientes pour cette protéine ainsi qu'à des souris contrôles, qui provoque une toxicité modérée au niveau des voies aériennes supérieures chez la souris. Nous évaluerons si la protéine que nous étudions est impliquée dans ce processus inflammatoire. Pour cela, nous suivrons différents paramètres physiologiques et immunitaires chez les souris asthmatiques, dont l'hyperréactivité bronchique. Ces paramètres physiologiques ne peuvent être mesurés que sur l'animal vivant.

Les animaux utilisés seront des souris C57BL6 WT et KO pour le facteur clé de l'immunité que nous avons découvert, mâles et femelles, âgées de 6 à 8 semaines et les expériences proposées nécessiteront 150 souris sur une période de 3 ans, dans deux procédures, une de sévérité légère et l'autre de sévérité modérée. Les différents protocoles expérimentaux ont été consciencieusement élaborés afin d'utiliser le moins de souris possible tout en permettant d'obtenir des résultats interprétables et statistiquement fiables, qui sont validés par tests statistiques. En pratique, les souris seront soumises à des tests de provocation bronchique par inhalation d'un allergène (sévérité modérée). Nous nous attacherons également à réduire au maximum la souffrance des souris tout au long de leur vie. Elles seront observées quotidiennement et si une souris perd plus de 20% de sa masse corporelle, elle sera euthanasiée. Pour conclure, notre projet devrait permettre de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques dans une pathologie dont le nombre de patients augmentent de plus en plus au fil des années.

7428 Ce projet comprend plusieurs modèles expérimentaux présentés ci-dessous :

- La Peste Porcine Africaine (PPA) est une maladie virale se manifestant par une fièvre hémorragique et touchant les porcs et les sangliers. Dans certains élevages de porcs, elle peut provoquer jusqu'à 100% de mortalité. La maladie est présente dans les pays du Caucase depuis 2007 et a été récemment introduite en Europe du nord et de l'est. Il existe de multiples voies de transmission de la PPA dont la transmission par morsure de tiques molles du genre *Ornithodoros*. L'introduction de la PPA en Europe justifie de travailler sur la compétence de ces tiques à maintenir et transmettre le virus de la PPA, ainsi que sur leur aptitude à entrer en contact et se gorger sur porcs. Pour mener ce genre d'études, la mise en élevage de représentants des différents groupes d'espèces de tiques vectrices est nécessaire, et il est indispensable de multiplier d'abord les tiques sur leurs hôtes naturels pour disposer d'un nombre suffisant d'individus avant de tenter d'élever les parasites dans des dispositifs d'alimentation artificielle.

- Cette même nécessité de multiplier dans un premier temps les tiques récoltées sur le terrain par gorgement sur leurs hôtes naturels concerne également d'autres tiques, dites dures, que nous souhaitons entretenir et qui sont impliquées dans la transmission de très nombreux agents pathogènes. C'est d'autant plus nécessaire que ces tiques font de très longs repas sanguins (5 à 12 jours contre quelques heures pour les tiques molles), ce qui complique la mise en place de l'alimentation artificielle. Les espèces que nous souhaitons élever sont les suivantes :

- *Amblyomma variegatum*. C'est une tique parasitant principalement les ruminants, bien que les stades immatures puissent également se gorger sur des petits mammifères ou des oiseaux. Originaires d'Afrique, elle est désormais présente sur certaines îles des Antilles et de l'océan Indien. Elle pose de graves problèmes sanitaires et économiques : (i) sa fixation provoque des pertes et des blessures importantes, (ii) sa présence aggrave les symptômes d'une maladie cutanée, la dermatophilose, et (iii) elle transmet la bactérie *Ehrlichia ruminantium* responsable d'une maladie mortelle, la cowdriose. D'autre part, diverses populations de la tique *A. variegatum* ont été identifiées. La mise en élevage de plusieurs de ces populations permettra d'obtenir des tiques en conditions contrôlées en s'affranchissant des cycles saisonniers naturels et ainsi tout à la fois d'étudier plus facilement certains aspects de la biologie de la tique et d'obtenir en quantité suffisante les échantillons nécessaires à l'étude des interactions entre hôte et vecteur et entre vecteur et agent pathogène.

- *Rhipicephalus bursa* et *Hyalomma marginatum* sont parmi les espèces les plus fréquentes chez les bovins en zone méditerranéenne, et sont présentes en France continentale et en Corse. Or, il a été prouvé qu'elles étaient capables de transmettre le virus de la dermatose nodulaire contagieuse (DNC, ou Lumpy Skin Disease en anglais), maladie bovine due à un capripoxvirus. D'origine africaine, cette maladie s'étend actuellement rapidement au Moyen-Orient et en Europe orientale (Turquie, Grèce, Bulgarie, Macédoine, Serbie...), provoquant des pertes directes mais aussi des contraintes économiques importantes (restrictions des déplacements et de la commercialisation des animaux). En plus d'être impliquées dans la transmission du virus de la DNC, les tiques pourraient également en être le réservoir, permettant son maintien d'une année à l'autre. Nous souhaitons vérifier si les tiques présentes localement peuvent maintenir et transmettre le virus, même si elles ne l'ont jamais rencontré auparavant. *R. bursa* est une tique qui se gorge sur les bovins à tous les stades de son cycle. En revanche, les larves et les nymphes de *H. marginatum* parasitent les petits mammifères et

les oiseaux. Pour étudier les possibilités de transmission du virus entre les stades ou d'une génération à l'autre, il sera nécessaire de les nourrir de façon artificielle, dans des dispositifs dans lesquels du sang infecté par le virus pourra être placé. Il est toutefois indispensable, dans un premier temps, d'établir et d'entretenir des populations de tiques sur lapin ou/et sur chèvres, de façon à obtenir une grande quantité d'individus pour l'expérience d'infection.

La règle des 3R sera respectée avec les dispositions suivantes; "Réduire": nous n'utiliserons que le strict minimum d'animaux pour maintenir les colonies de tiques le temps d'adapter les systèmes de nourrissage artificiels, "Remplacer": le projet a pour but de développer des systèmes de nourrissage artificiels afin de s'affranchir des animaux pour l'élevage des colonies de tiques, "Raffiner": le nourrissage des tiques sur animaux est un processus indolore et peu angoissant se déroulant sur des temps assez courts (1 heure à quelques jours en fonction des espèces de tiques), néanmoins des procédures d'habituation et d'accompagnement des animaux (déjà éprouvées et validées) seront mises en place pour chaque phase de nourrissage.

Nombre d'animaux : 40 porcelets, 16 chèvres et 84 lapins sur les 5 ans du projet.

7429 Ce projet est consacré aux douleurs chroniques. Contrairement à la douleur aiguë, les douleurs chroniques ne servent plus de signal d'alarme, elles persistent longtemps après l'affliction originelle et sont considérées comme des maladies. En plus des douleurs physiques, elles entraînent également de sérieux désordres affectifs et cognitifs (anxiété et dépression en premier lieu) qui nuisent fortement à la qualité de vie des patients. Il s'agit de pathologies fréquentes puisque le nombre de personnes souffrant ou ayant soufferts de douleur chroniques en Europe est estimée à environ 20% de la population. Malheureusement, l'efficacité des thérapies actuelles est limitée puisque moins de la moitié des patients voient leurs douleurs soulagées et souvent avec des effets secondaires centraux. Certaines de ces douleurs, appelées douleurs neuropathiques qui touchent près de 7% de la population, sont notamment résistantes à la morphine qui reste l'analgésique le plus puissant à ce jour. La prise en charge de la douleur chronique est notamment rendue complexe par son aspect multidimensionnel (sensoriel, affectif-émotionnel, cognitif...). Toutefois, la considération à la fois de l'impact physique et émotionnel de la douleur est encore insuffisamment prise en compte. En effet, les traitements médicamenteux actuels ont généralement pour but de réduire la transmission des messages nociceptifs. Il y a donc un besoin crucial de nouveaux analgésiques avec de nouveaux modes d'action ciblant à la fois les composantes sensorielles, émotionnelles et cognitives affectées par la douleur chronique. Une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques moléculaires et cellulaires de la douleur est essentielle pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques pour le traitement des douleurs chroniques.

L'objectif des expériences décrites dans cette saisine est d'évaluer le rôle potentiel d'un mécanisme neuromodulateur à la fois dans la régulation des réponses émotionnelles et sensorielles lors de douleurs chroniques dans l'espoir d'identifier et de proposer une nouvelle piste thérapeutique pour le traitement des douleurs chroniques.

Ce mécanisme neuromodulateur est associé aux récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluRs) qui sont présents tout au long des voies de la douleur où ils régulent la transmission de l'information. Ils sont notamment localisés dans l'amygdale, une région particulière du cerveau très impliquée dans les réponses émotionnelles associées aux stimuli sensoriels et l'intégration des informations douloureuses. Nous disposons de différents composés sélectifs pour ces différents récepteurs, certains « classiques » et d'autres contrôlables par la lumière que nous avons développée par chimie médicinale et pharmacologie moléculaire et qui sont capables de réguler précisément dans le temps et l'espace ces récepteurs. De plus, grâce à l'utilisation de lignées murines spécifiques invalidées pour les récepteurs métabotropiques du glutamate, nous permettra d'étudier et de cibler plus spécifiquement l'implication de ce système.

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour cette étude car il n'existe pas à ce jour de modèle alternatif à l'animal pour étudier la réponse émotionnelle et sensorielle à la douleur. Les réactions comportementales observées sont intégrées et ne peuvent pas être modélisées en système de culture cellulaire, ou prédit par les neurosciences computationnelles. Néanmoins, notre démarche est conforme à la règle des 3R et aux recommandations sur l'éthique de l'expérimentation animale de la douleur (Zimmermann, 1983). Au préalable, afin de mieux cibler les traitements expérimentaux,

l'activité sur sa cible moléculaire de tout candidat analgésique qui sera testé dans le cadre de cette étude aura été validée *in vitro* dans des modèles cellulaires. L'outil statistique a été utilisé pour définir au plus juste la quantité d'individus requise pour mener cette étude. De plus, pour réduire le nombre total de souris, les animaux utilisés pour la caractérisation comportementale seront ensuite utilisés pour les analyses biochimiques ou immunohistochimiques. Le besoin total a ainsi été estimé à 532 souris.

7430 La perte de masse musculaire due au vieillissement (i.e. sarcopénie) est l'un des principaux facteurs de risques de perte d'autonomie entraînant un plus grand isolement ainsi qu'une morbidité plus importante. Nos études préliminaires effectuées *in vitro* ont permis d'établir un lien entre le déficit d'une protéine télomérique dans la cellule musculaire et l'augmentation du niveau de stress oxydatif. Néanmoins, la culture cellulaire ne peut résumer la réalité physiologique d'un organisme entier, spécialement le muscle, tissu majoritairement post-mitotique et innervé qui n'est pas reproductible *in vitro*. Afin de confronter ces données à la réalité *in vivo*, nous proposons d'établir un modèle de souris sarcopénique en appliquant un protocole d'activité et d'endurance physique sur des lignées murines déjà établies dans notre équipe comprenant l'invalidation spécifique de la protéine télomérique dans les fibres musculaires matures

Cette invalidation a déjà été caractérisé et engendre un phénotype léger de vieillissement musculaire. La mise à l'épreuve, pendant 6 mois, d'un nombre limité de souris par des protocoles d'activité physique encadré (i.e., courses sur tapis sur périodes restreintes) a pour but d'amplifier ces phénotypes afin d'obtenir un modèle animal de sarcopénie, plus proche de l'homme, sans épuisement de l'animal. Nous considérerons d'appliquer le protocole sur 3 lignées comprenant la lignée KO dans le muscle pour la protéine télomérique, et deux lignées contrôles, l'une porteuse du gène codant pour la recombinaison Cre spécifiquement dans le muscle (à long terme l'expression de la recombinaison Cre peut engendrer des altérations du génome) et la lignée contrôle porteuse du gène télomérique encadrée des séquences ADN recombinantes sous l'action de la recombinaison Cre. Le protocole sera appliqué à deux âges, l'un à 3 mois (souris jeunes) et à 12 mois (souris dite vieilles). Nous utiliserons 12 souris par lignées séparés en deux groupes (6 Sédentaires, 6 Endurances) afin d'obtenir des résultats fiables, et 7 souris pour les souris âgées afin de compenser un éventuel décès sur la durée, sachant que 5 souris représente la limite d'échantillonnage pour appliquer des tests statistiques de comparaison de données non paramétriques. Cela fera un total de 78 souris. En fonction des premières expérimentations sur souris contrôles, le nombre de souris par groupe pourra être diminuer si possible (i.e., 5 / groupe ; 60 total). Une étude préliminaire va d'abord être faite sur une cohorte âgée de 1 an mixte mâle/femelle de 10 animaux comprenant le génotype contrôle et le génotype d'intérêt afin d'évaluer l'influence du sexe sur la réponse du muscle à l'effort. Cela portera à 88 le nombre total de souris soumises à l'expérimentation. Les souris seront contraintes à la course progressivement avec d'abord une période de 15 jours pour habitude à l'environnement matériel nécessaire à la course (prise de connaissance du tapis de course). Les souris seront encouragées par la voix et stimulées de façon douce manuellement par l'expérimentateur. Une souris pour laquelle les stimulations manuelles et par la voix ne seront plus suffisantes et qui présentera des signes de fatigue sera retirée du protocole de course. Suite aux protocoles d'endurances, les souris seront caractérisées par une série d'analyses de tests de forces (tests d'agrippements) qui permettront une évaluation de leurs conditions physique tout au long du protocole. Une baisse anormale de leurs performances impliquera un retrait immédiat de l'animal. A l'arrêt du protocole, les souris seront euthanasiées et les muscles prélevés exploitées pour des analyses biologiques (RT-qPCR, WB, ChIPSeq), métabolique (mitochondries) et histologique (fibres musculaires).

7431 La maladie de Parkinson est due à la perte accélérée de cellules nerveuses, les neurones, et de leurs connexions, les synapses, dans les régions cérébrales comme la substance noire et le striatum. La neurotoxicité des fibrilles d'alpha-synucléine, protéine impliquée dans cette maladie; a été démontré par notre laboratoire. Cette protéine s'agrège dans certaines parties du cerveau des patients touchés par cette maladie, ce qui engendre la mort des neurones. La prévalence actuelle de cette pathologie ne peut qu'augmenter puisqu'aucune solution thérapeutique réellement efficace n'a encore été validée pour préserver ou restaurer la perte des neurones.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) en utilisant une plateforme d'analyse préclinique *in vivo* (souris) visant à évaluer leur effet protecteur, empêchant l'agrégation des peptides neurotoxiques (observée à un mois dans notre modèle) et les phénomènes de mémoire (observés à 3 mois dans notre modèle), précurseurs de la maladie de Parkinson.

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 impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels auront été évalués préalablement sur des cultures de cellules nerveuses. - Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* sont alors testés *in vivo* (ce qui permet de réduire considérablement le nombre d'animaux impliqués dans les tests *in vivo*, si le test *in vitro* précédent n'était pas effectué).

L'étude *in vitro* des effets des candidats médicaments sur l'agrégation et la mémoire n'est pas possible car le phénomène d'agrégation et de propagation de ces agrégats dans certaines zones du cerveau nécessitent le cerveau entier.

Les phases précoces de ces maladies neurodégénératives sont modélisées chez la souris (C57Bl/6J, lignée de souris classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection intracérébrale unique, effectuée dans des conditions aseptiques et sous anesthésie générale, de peptide neurotoxique (raffinement). Les animaux sont traités par un anti-inflammatoire ayant aussi des propriétés analgésiques, avant et après la chirurgie (raffinement) afin de minimiser la douleur. Ainsi, après leur réveil, suivant la chirurgie, les animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement). Les animaux exposés à ces peptides développent des agrégats, 30 jours après l'injection cérébrale, caractéristiques des phases précoces des maladies neurodégénératives.

Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal, où qu'une inflammation due à l'injection intracérébrale ou aux candidats médicaments soit notée, l'animal sera euthanasié immédiatement. Tous les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude. Notre modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et très solides quant aux effets neuroprotecteurs de candidats médicaments pour le traitement et/ou la prévention de la maladie de Parkinson. Ce projet de cinq ans nécessite 1240 souris pour l'étude de 20 composés en 5 ans.

Les avantages des modèles développés (par rapport aux modèles de souris transgéniques classiquement utilisés pour ce genre de développement) sont divers : optimisation du nombre de composés à tester chez l'animal (réduction du nombre de composés potentiellement inactifs et donc d'animaux), optimisation du nombre d'animaux par groupe expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique. Les enjeux socio-économiques du projet sont évidents tant le développement de pathologies neurodégénératives liées à l'âge impacte les sociétés.

7432 En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires.

En France, le cancer est la cause d'environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes.

L'utilisation de l'immunothérapie représente une avancée scientifique majeure dans la lutte contre le cancer. En effet, elle utilise les caractéristiques du système immunitaire en particulier des lymphocytes T, qui détectent et éliminent les attaques extérieures (microbes, virus, bactérie) et notamment les cellules tumorales de notre organisme. Or, les cellules cancéreuses envoient des signaux qui modulent l'activité de ces lymphocytes T. Ces derniers sont alors moins efficaces pour lutter contre les cellules tumorales.

Ainsi le but des traitements d'immunothérapie est de favoriser l'infiltration dans la tumeur de cellules immunitaires pouvant lutter contre les cellules tumorales, et les aider à contourner les mécanismes de protection des tumeurs pour les détruire. Plusieurs stratégies peuvent être employées :

- L'immunothérapie dite active est basée sur le principe de la vaccination : elle stimule les défenses immunitaires du patient pour prévenir les récurrences ou pour traiter les cancers métastatiques. Des

petites molécules sont utilisées pour cibler directement les voies de signalisation impliquées dans l'activation et la prolifération des cellules immunitaires.

- L'immunothérapie dite adoptive consiste à injecter au patient des cellules "éduquées" qui agissent contre les cellules cancéreuses. C'est le cas des CAR-T cells qui sont des Lymphocytes T sur lesquels a été ajouté un attribut (type anticorps) permettant de reconnaître un récepteur spécifique de la cellule tumorale. Lors de l'interaction anticorps-récepteur, un signal est transmis à la cellule T pour enclencher une réaction de destruction de la cellule tumorale.
- Enfin l'administration de molécules qui agissent sur des points de contrôle immunologique. Ces points de contrôle sont des protéines présentes à la surface des cellules saines de l'organisme qui servent à réguler la réponse immunitaire en freinant ou en boostant la stimulation des lymphocytes T. Les tumeurs peuvent également exprimer certaines de ces protéines, leur permettant de passer inaperçu vis-à-vis du système immunitaire. L'objectif consiste donc à détruire les cellules tumorales en administrant une molécule capable d'inhiber spécifiquement les protéines de freinage de manière à favoriser la stimulation des cellules immunitaires anti-tumorales pour induire une réaction immunitaire vis-à-vis de la tumeur.

Bien que ces approches représentent des succès en clinique, certains cancers présentent malgré tout des résistances après traitement et imposent de poursuivre la recherche et le développement de nouvelles thérapies ciblant le système immunitaire afin de trouver des traitements adaptés à ces résistances. Les phases d'études et de développement de ces nouvelles thérapies sont validées dans un premier temps *in vitro* notamment par la sécrétion par les cellules immunitaires de marqueurs d'activation tels que l'IL-2 et IFN γ), puis le choix de l'animal reste incontournable, de par sa complexité physiologique, dans l'évaluation de l'efficacité des traitements.

A la différence des modèles dédiés à rechercher des thérapies chimiques efficaces sur des tumeurs humaines greffées chez des souris immunodéprimées (évitant ainsi les phénomènes de rejet), ces modèles nécessitent la présence d'un système immunitaire.

L'objectif de ce projet est de rechercher de nouvelles immunothérapies efficaces dans des modèles de souris dites humanisées. Pour cela, des souris dont le système immunitaire est déficient reçoivent une greffe de cellules immunitaires d'origine humaine, et vont ainsi porter un système immunitaire 'humain' fonctionnel.

L'efficacité anti-tumorale d'entités biologiques et chimiques sera ensuite évaluée sur des tumeurs humaines greffées sous la peau du flanc de ces souris, permettant ainsi d'estimer les interactions du traitement, avec le système immunitaire et la tumeur.

Ce projet comporte plusieurs phases, dédiées à déterminer les conditions expérimentales optimales pour effectuer l'évaluation de l'activité de ces nouvelles entités chimiques et biologiques ciblant le système immunitaire en confirmant leur potentiel d'activation dans un premier temps puis, dans un second temps, en évaluant leur capacité à lever l'inhibition du système immunitaire provoquée par les cellules tumorales.

Chaque design expérimental des différentes phases est déterminé en concertation avec notre service statistique, contribuant ainsi à une utilisation d'un nombre d'animaux le plus juste.

Dans le but également de limiter l'utilisation des animaux, nous utilisons, dans la mesure du possible, des techniques non invasives comme l'imagerie optique qui nous permettent de suivre sous simple anesthésie l'invasion des cellules immunes ou la dissémination de cellules tumorales dans l'organisme de l'animal au cours du temps.

Dans un souci de bien-être animal, nos animaux sont stabulés en groupes sociaux tout au long de l'expérimentation. Ils bénéficient de plus, d'un enrichissement dédié, leur permettant de nidifier (tubes de coton « cocoon »). Ils font de plus l'objet d'une surveillance spécifique et accrue dans les phases les plus critiques de l'établissement des modèles afin d'anticiper au plus tôt une altération de leur état général et de mettre en place les mesures nécessaires afin d'éviter toute souffrance.

Ce projet est considéré comme de gravité modérée pour les animaux.

Ces études prévoient l'utilisation de 5440 animaux maximum pour l'ensemble du projet soit sur une période de 5 ans.

7433 Objectif du projet : Évaluer l'activité toxicologique *in vivo* de nouvelles entités chimiques (NCE), destinées à être administrées chez l'homme, après administration répétée par voie dermale (voie clinique cible) et/ou par une voie systémique chez le mini-porc, la souris ou le rat. En effet, les programmes réglementaires d'évaluation de la sécurité non clinique doivent comprendre deux espèces pertinentes : un rongeur (rat – souris) et un non-rongeur (mini-porc). Les espèces animales retenues sont choisies pour leur capacité à prédire le mieux possible les effets indésirables susceptibles de se produire chez l'Homme.

Avantages : Les procédures expérimentales mises en œuvre permettent de documenter précocement l'activité toxicologique *in vivo* du produit d'intérêt et de définir une dose sans effet indésirable (NoObservedAdverseEffectLevel) reliée à un niveau d'exposition systémique. Les données ainsi obtenues contribueront à la sélection de molécules candidates, à estimer une marge de sécurité et au choix des doses à utiliser chez l'homme dans les études cliniques de durée équivalente et pour les indications thérapeutiques ciblées. Aussi, ces procédures adressant la toxicité du futur médicament (organes/tissus cibles) par une voie systémique (souvent la voie orale) et dermale, sont conduites conformément aux règles de Bonnes Pratiques de Laboratoire et ne dupliquent aucune procédure déjà réalisée.

Dommages escomptés : En fonction des cibles toxicologiques, et en accord avec les lignes directrices réglementaires internationales, il est obligatoire de documenter au préalable des études cliniques l'évaluation de la sécurité du produit sur l'animal. La sélection de points limites appropriés (eu égard à la molécule testée) et l'utilisation de produits analgésiques (si jugé nécessaire par le vétérinaire désigné) seront prévues.

Méthodes alternatives (principe de remplacement) : Il n'existe aucune méthode *in vitro* validée scientifiquement ou test réglementaire reconnu par la législation de l'Union Européenne qui offrirait une alternative à l'expérimentation animale pour répondre aux questions de toxicologie générale adressées dans ce projet.

Nombre et type d'animaux; conditions d'hébergement et de soins (principe de réduction et principe de raffinement) :

-Choix des espèces : Les espèces mini-porc, souris et rat sont utilisées en raison de l'abondance de littérature sur ces modèles. De plus, en dermatologie, l'espèce mini-porc est préférentiellement utilisée en raison de sa similitude histologique de la peau avec l'homme

-Nombre d'animaux : Selon les méthodes d'analyses utilisées (réponses cliniques et biologiques) et compte-tenu des variations interindividuelles anticipées, le nombre d'animaux utilisés dans ce projet a été réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet et en accord avec le nombre exigé par les lignes directrices réglementaires. Ce projet comporte 7 procédures expérimentales et le nombre prévisionnel d'animaux (incluant les animaux dédiés aux actions potentielles d'acquisition et de maintien des compétences pour l'ensemble des procédures expérimentales présentées dans ce projet) sur 5 ans sera de :

- 4910 rats (dont 200 rats maximum pour la formation)

- 4565 souris (dont 200 souris maximum pour la formation)

- 1680 mini-porcs (dont 10 mini-porcs maximum pour la formation)

Conditions d'hébergement et de soins :

Les conditions d'hébergement et de soins, et les méthodes utilisées, ont été choisies et conçues de manière à réduire au maximum toute douleur, souffrance, angoisse ou dommages durables que pourraient ressentir les animaux, en conformité avec les législations française et européenne en vigueur. La stratégie d'enrichissement, adaptée aux besoins spécifiques et individuels des animaux, est régulièrement revue et mise à jour.

7434 Le contexte de notre étude : La découverte de récepteurs régulateurs de la réponse immunitaire, présent à la surface des cellules T, et leur blocage par action d'anticorps monoclonaux a révolutionné la prise en charge de certaines pathologies comme celle du cancer de la peau métastatique. Cette révolution qui restera comme une avancée majeure du 21^{ème} siècle a des répercussions beaucoup plus larges et s'étend à ce jour à un grand nombre d'autres pathologies comme différents cancers mais aussi des

pathologies infectieuses chroniques (HCV, HIV) ou à l'opposé les maladies auto-immunes ou les rejets de greffes.

Les objectifs et les dommages de notre étude : Le modèle d'étude que nous proposons dans cette demande apportera des données cruciales pour la compréhension du mode d'action des récepteurs inhibiteurs ciblés par les anticorps thérapeutiques existants et pour ceux en cours de développement. Notre étude permettra d'aborder des questions essentielles portant sur la régulation fine de la réponse immunitaire et sa modulation positive ou négative exercée par les récepteurs présents à la surface des cellules T. Cette étude utilise principalement un modèle de souris déjà existant et bien caractérisé depuis plus de dix ans par notre équipe de recherche. Dans ce modèle une modification génétique conduit à une dérégulation rapide et spontanée de l'homéostasie des cellules T CD4+. Les résultats préliminaires indiquent une altération des voies de régulation des récepteurs immunomodulateurs et en font un modèle d'étude pertinent.

Conformité de notre étude avec la règle des 3R :

Remplacer : Au cours des dix années précédentes nous avons essayé de reproduire la pathologie observée dans un modèle cellulaire malheureusement sans succès à ce jour. L'interaction de différents types cellulaires est très certainement nécessaire au développement de cette pathologie qui ne peut donc en l'état des connaissances actuelles n'être observée que sur le modèle animal. Notre objectif est de comprendre cette pathologie pour pouvoir la modéliser en un modèle cellulaire *in vitro* permettant des tests précliniques de composés immunomodulateurs.

Réduire : Un nombre minimal d'animaux seront inclus dans les différentes procédures pour assurer une analyse statistique satisfaisante. La bonne connaissance du modèle par le laboratoire assure une optimisation des protocoles appliqués et une utilisation optimale des animaux produits. Pour chaque procédure le nombre d'animaux concerné a été évalué avec précision Le projet faisant l'objet de cette demande est proposé pour cinq années, il utilisera un maximum de 4275 souris provenant soit de fournisseurs agréés soit élevés sur site.

Raffiner : Les protocoles décrits sont établis en accord avec la réglementation actuelle et le respect du bien-être. Les animaux sont hébergés en portoirs ventilés avec distribution d'eau automatique. Les animaliers effectuent le change complet des cages une fois par semaine et la vérification de la nourriture et de la fourniture d'eau 7 jours/7. Le contrôle sanitaire complet de chaque zone de l'animalerie est effectué tous les trois mois sur des animaux sentinelles. Afin de diminuer le stress des animaux, les paramètres et l'enrichissement mis en œuvre dans notre animalerie sont les suivants : maximum de 5 animaux adultes par cage, température régulée, environnement sans nuisances sonores, photopériode contrôlée, complété par un enrichissement dans la cage avec du matériel pour confectionner des nids et l'addition de dômes protecteurs. Nous utilisons pour toutes les procédures des animaux adultes de plus de 6 semaines. Les procédures utilisées pour cette demande sont soit de classe légère, et dans ces cas effectués sur animaux vigiles, soit de classe modérée et dans ce cas toujours effectuées sous anesthésie de courte durée avec l'observation des animaux jusqu'à leur réveil et leur retour à une activité normale. Les procédures expérimentales sont discutées avec le « comité bien-être » de la structure et modifiées en suivant les recommandations de ce comité. Ainsi la gestion de la douleur légère ou modérée infligée aux animaux est toujours gérée de manière appropriée.

Points limites : Nous n'avons dans cette demande aucune classe de procédure sévère.

Dans le modèle animal que nous utilisons, une pathologie pouvant être inconfortable pour l'animal se développe chez des individus de plus de 15 semaines, en conséquence les animaux entrant en expérimentation ou non sont euthanasiés avant cet âge limite.

7435 Le but de ce travail sera d'évaluer les capacités immunomodulatrices de la lactoferrine lorsque la perméabilité intestinale est augmentée. L'épithélium intestinal constitue une frontière entre le milieu intérieur et l'environnement extérieur. Son rôle est crucial dans la protection contre les composés potentiellement délétères présents dans le contenu intestinal. Ses principales fonctions sont l'absorption et la digestion terminale des nutriments. Il est en permanence colonisé par une communauté riche en micro-organismes, le microbiote intestinal. Un équilibre de l'écosystème intestinal est nécessaire pour préserver l'efficacité de la barrière intestinale. L'épithélium intestinal a

la particularité d'être constitué d'une monocouche de cellules épithéliales se renouvelant toutes les 36 heures. Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées jouant un rôle-clé dans cette fonction barrière. L'altération de cette barrière favorise le développement de maladies dites « de civilisation » incluant les phénomènes allergiques et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. L'augmentation de la perméabilité intestinale est de plus en plus incriminée dans certains désordres auto-immuns et dans plusieurs autres pathologies telles l'obésité, l'arthrose... Notre laboratoire s'intéresse aux effets santé de la lactoferrine depuis de nombreuses années, nous avons déjà démontré *in vitro* et *in vivo* que la lactoferrine est capable de réduire la mort cellulaire programmée et de favoriser la différenciation des cellules intestinales. Cependant aucune étude n'a encore démontré les capacités immunomodulatrices de la lactoferrine lorsque la perméabilité intestinale est altérée.

La lactoferrine est une glycoprotéine présente dans le colostrum et le lait, qui joue des rôles biologiques très divers et qui intervient dans les défenses immunitaires de l'organisme. En présence de lactoferrine, les bactéries pathogènes seraient fortement inhibées voire éliminées. La lactoferrine possède une affinité très élevée pour le fer. Cette capacité de la lactoferrine à lier le fer présent dans l'environnement des bactéries réduirait leur croissance et leur capacité à se reproduire. Elle a également des propriétés antibactériennes, antivirales, antifongiques, anti-inflammatoires, anti-oxydantes et immunomodulatrices. Chez les individus sains, la lactoferrine se concentre au niveau des orifices corporels (bouche, nez, yeux) qu'elle protège des invasions infectieuses. Nous nous proposons au cours de cette étude d'évaluer le rôle de la lactoferrine ingérée dans l'amélioration de la réponse immunitaire et la protection de la fonction barrière. Les animaux seront traités par une endotoxine (les endotoxines sont des toxines situées dans la membrane externe de certaines bactéries Gram négatif, de nature lipopolysaccharidique (LPS) et thermostables) qui perturbe les fonctions intestinales et crée une situation inflammatoire. Les endotoxines libérées lors de la lyse des bactéries peuvent occasionner une réponse inflammatoire générale.

Dans la mesure où le but final du projet est la mise au point d'un produit santé qui sera ingéré, il convient de tester l'effet de la lactoferrine *in vivo*. Nous testerons la capacité de la lactoferrine à augmenter la résistance de l'épithélium intestinal et à atténuer la réponse immunitaire induite par les LPS lorsque différentes doses de lactoferrine sont ingérées pendant des périodes variables avant l'induction de l'hyperperméabilité intestinale provoquée par le LPS. Afin de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés et de respecter le bien-être animal, nous réaliserons dans un premier temps une étude qui nous permettra de définir les conditions d'utilisation de la lactoferrine et les doses de LPS à utiliser. Cette étude sera réalisée uniquement chez les souris mâles C57BL/6 pour lesquelles la réaction aux LPS a déjà été décrite. Au cours de cette étude les animaux ingéreront une dose de lactoferrine dont l'efficacité à réduire la production de cytokines inflammatoires a déjà été démontrée au laboratoire. Elle permettra de définir non seulement la période minimale d'ingestion de la lactoferrine (entre 1 et 7 jours) mais également la dose de LPS, cette étude inclura 150 animaux. Par la suite, afin de tenir compte de la variabilité de la réponse immunologique des individus nous évaluerons l'effet de diverses concentrations de lactoferrine sur deux souches de souris (Balb/c et C57BL/6) mâles et femelles (320 souris). Par la suite nous testerons l'efficacité de fractions protéiques laitières incluant des concentrations variables de lactoferrine. Cette étude sera effectuée sur une seule souche de souris et évaluera non seulement la réponse immunologique mais également l'impact de la lactoferrine sur la perméabilité intestinale après un épisode de stress. Ce test inclura 240 animaux pour 4 fractions, il est susceptible d'être renouvelé une deuxième fois soit un total de 480 souris.

Au maximum, le nombre total d'animaux utilisé sera de 960. Ces expériences seront menées, sur 5 années (environ 200 souris/an), dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux par groupe est dépendant des expérimentations, et tient compte du minimum d'animaux exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés. Nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les conditions d'hébergement seront améliorées par enrichissement du milieu (maisonnettes) et les procédures stressantes pour les animaux seront limitées au maximum. Lors de la période d'adaptation et lorsque que les animaux ingéreront la lactoferrine ils seront placés en cage collective. Au cours de l'expérimentation (6 heures ou 4 jours) les souris seront hébergées en cage individuelle. Les conditions d'hébergement en cage individuelle transparente seront améliorées par enrichissement du milieu (maisonnettes, nid et tunnel en PVC sanitaire opaque adapté aux souris).

Des prélèvements de sang à la queue seront effectués par des personnes formées. Le prélèvement de sang intracardiaque sera réalisé sous anesthésie à l'isoflurane afin de réduire le stress et la douleur. A la fin de l'expérimentation les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les effets de la lactoferrine lors du traitement au LPS sur les paramètres immunitaires et les altérations de la muqueuse intestinale. Les résultats de ce projet de recherche pourront permettre de développer de nouveaux compléments alimentaires afin d'améliorer la santé et le fonctionnement du système intestinal, notamment en situation d'inflammation, une situation préoccupante en clinique humaine.

7436 La capacité de garder en mémoire une expérience est essentielle pour la survie des organismes supérieurs. Cette capacité est en partie assurée par une structure cérébrale appelée hippocampe. Les neurones de cette structure sont capables de modifier leurs connexions en fonction des informations qu'ils reçoivent, autrement dit, ils sont capables de « plasticité synaptique ». Les informations qu'ils reçoivent peuvent les activer ou les inhiber, et la balance existant entre l'excitation et l'inhibition des neurones résulte en un codage de l'information reçue. Ces mécanismes jouent un rôle dans le stockage de la mémoire. Une des sous-régions de l'hippocampe (CA3) est impliquée dans la mémoire des événements vécus dans leurs contextes, appelée « mémoire épisodique ».

Pour développer la représentation d'un contexte, les neurones doivent être capables de recevoir et d'intégrer les informations sensorielles multiples relatives à ce contexte. Les neurones du CA3, recevant des projections de plusieurs cortex dont certains connus pour recevoir des informations sensorielles (cortex entorhinal), sont stratégiquement positionnés pour permettre cette intégration.

Pour pouvoir confirmer cette hypothèse, il est nécessaire d'étudier et caractériser le fonctionnement *ex vivo* et *in vivo* des circuits corticaux contactant CA3, ainsi que le rôle joué par la plasticité synaptique dans ces circuits. Le projet propose d'étudier *in vivo* le fonctionnement des projections corticales à CA3, à l'aide d'enregistrements de l'activité électrique des neurones chez la souris anesthésiée. Grâce à une technique appelée « optogénétique », il sera possible d'activer ou de rendre silencieuse une population de neurones en les stimulant avec de la lumière. Ces manipulations permettront d'enregistrer la réponse de certains neurones après activation et/ou inhibition d'autres neurones, et donc de mieux comprendre le fonctionnement des réseaux du CA3 dans le cerveau intact.

Les données sont difficiles à obtenir, l'expérience du laboratoire a montré que plusieurs animaux (4-5) sont nécessaires pour obtenir un enregistrement exploitable et en extraire des conclusions correctes. Nous avons besoin de 20 données par condition expérimentale, de cette manière 100 animaux/condition nous permettront d'obtenir résultats suffisants. 600 souris seront donc nécessaires pour ce projet et ce chiffre tient aussi compte des différents contrôles à effectuer. Tout au long du projet, j'analyserai et tiendrai compte de chaque résultat obtenu, de manière à raffiner le nombre d'animaux nécessaire au bon déroulement du projet. Dans chaque expérience, des précautions seront prises pour diminuer l'impact stressant et douloureux des procédures expérimentales (utilisation d'analgésiques locaux, suivi post-opératoire, régulation thermique, contrôle de la fonction respiratoire...).

7437 Plusieurs programmes de recherche menés dans notre laboratoire proposent de nouvelles stratégies thérapeutiques recourant à l'effet bénéfique du froid sur les tissus nerveux.

Pour limiter le recours aux modèles animaux, nous projetons de mener certaines phases de ces programmes de recherche sur des modèles *ex vivo*, afin notamment de tester les effets du refroidissement sur des cultures primaires de neurones et de cellules gliales. Dans ce cadre, nous souhaitons prélever des cellules au niveau de l'encéphale d'embryons de souris afin de les mettre en culture.

Pour cette étude, travailler sur un modèle de culture cellulaire primaire nous permet de s'approcher au mieux du modèle *in vivo*. L'étude de la réaction cellulaire au froid (viabilité, prolifération, apoptose, cycle cellulaire...) nous permettra d'établir les mécanismes cellulaires liés au refroidissement et de déterminer les conditions optimales de refroidissement en vue d'une application *in vivo*.

Nous souhaitons donc réaliser, sur un modèle rongeur, un prélèvement des sacs embryonnaires (E18) sur une femelle gestante anesthésiée, afin de réaliser la mise en culture primaire des cellules de ses

embryons. Après euthanasie des embryons, leurs cerveaux seront disséqués et tamisés, et les neurones et les cellules gliales seront déposés sur boîtes de Pétri en vue de cultures cellulaires primaires.

Dans ce protocole, le projet prévoit le recours à un total de 2200 souris C57BL/6 commandées au fur et à mesure des besoins de mise en culture des cellules d'embryons (200 femelles gestantes et 2000 embryons). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire, en considérant que chaque animal sera commandé seulement si l'utilité des cultures a été déterminée au préalable. Les souris commandées seront garanties gestantes, ce qui nous permet d'assurer la présence de sacs embryonnaires. Cette démarche permet de réduire le nombre de souris utilisées sans compromettre la validité des expériences menées et en conservant un nombre d'animaux suffisant pour obtenir des résultats fiables. Aucun modèle alternatif ne permet à ce jour d'établir des cultures primaires de différents types de cellules neuronales sans utiliser d'animaux. Enfin, tous les efforts sont consentis pour détecter et prendre en charge efficacement toute forme de souffrance des animaux pendant leur hébergement à l'animalerie. Une période d'habituation de deux jours est prévue après l'arrivée des animaux au sein de l'animalerie et leur état de santé sera surveillé et évalué quotidiennement pendant ces deux jours.

7438 Le tube digestif de l'homme et de nombreuses espèces animales renferme un grand nombre de microbes – principalement des bactéries, mais aussi des virus, des parasites, des champignons ou des levures – qui constituent le microbiote intestinal.

Ces microbes, résidents normaux de l'environnement digestif ou seulement en transit avec l'aliment, interviennent dans les fonctions digestives et physiologiques générales de l'organisme. *Candida albicans* est une levure commensale facultative du tube digestif de l'homme, normalement inoffensive quand elle est présente en faible quantité au sein du microbiote intestinal. Les facteurs qui contrôlent la colonisation intestinale à *C. albicans* sont mal connus. Dans des conditions de stress, *C. albicans* peut proliférer et se transformer en véritable pathogène responsable d'infections généralisées parfois mortelles chez des individus fragilisés (patients hospitalisés, jeunes enfants, individus avec des déficits de leur immunité).

L'objectif principal de ce projet est d'étudier les facteurs de virulence de *C. albicans* qui contribuent au maintien d'un haut niveau de colonisation intestinale chez l'hôte et à la survenue d'infections. Nous inoculerons des souris soumises à des facteurs de stress (produits chimiques), comme des antibiotiques ou des immunosuppresseurs afin d'analyser d'une part, les différentes étapes de la colonisation intestinale par *C. albicans* et de la survenue d'infections et d'autre part, leur impact sur l'évolution des génomes de *C. albicans* dans le tube digestif.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension de la biologie et de la pathogénicité de *C. albicans*, principale espèce fongique responsable d'infections chez l'homme. Le but à plus long terme est de développer de nouvelles approches thérapeutiques pour limiter ou empêcher la colonisation digestive puis les infections à *C. albicans* chez les patients à risque.

Les effets néfastes attendus pour les animaux sont le plus souvent limités. Les animaux pourront avoir de la diarrhée et maigrir. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Cependant chez certains animaux nous devons causer des infections par injection intraveineuse de levures. L'évolution de ces infections pourrait entraîner le décès des souris en quelques jours selon les souches utilisées.

Cette expérimentation se place dans le respect des principes éthiques des 3R – Remplacement, Réduction, Raffinement.

Le recours à l'animal est indispensable car le microbiote digestif est très complexe tant dans sa composition que dans son aspect dynamique et ne peut pas être reproduit de façon adéquate *in vitro*. Les tests préalables que nous avons réalisés *in vitro* et *ex-vivo* sur des lignées cellulaires nous ont permis d'identifier certains facteurs de virulence chez *C. albicans*. Leur implication dans la capacité de *C. albicans* à coloniser le tube digestif et causer des infections ne peut désormais être appréhendée que chez l'animal, en modulant son microbiote intestinal et/ou son immunité naturelle.

Le nombre de souris nécessaires a été évalué à un maximum de 734 sur 3 ans. Elles seront hébergées par groupe de 5 au maximum avec du matériel d'enrichissement dans la cage. Lorsque des souris seront immunodéprimées, elles seront maintenues dans un environnement protégé pour

réduire le risque d'infection avec d'autres germes pathogènes. Nous avons préalablement consulté un biostatisticien pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé et permettre une analyse statistique des résultats (tests non paramétriques - Chi2 et test de Mann et Whitney- adéquat pour les petits effectifs, courbe de survie, en fonction des paramètres étudiés).

Nous mettrons en œuvre un suivi quotidien du comportement des souris pour surveiller le bien-être de l'animal et nous appliquerons les points limites suivants : si l'expérimentateur constate que des animaux sont amaigris, c'est-à-dire si la perte de poids est égale à 20% du poids mesuré en début d'expérimentation, ou deviennent sérieusement malades, c'est-à-dire si l'animal devient prostré, ou émet des excréments (fèces) liquides ou si son poil est hérissé, il sera euthanasié immédiatement.

7439 Parmi l'ensemble des lymphomes, les lymphomes T périphériques (PTCL) sont parmi ceux dont le pronostic reste le plus sombre. Le développement de modèles murins reste très limité dans la maladie, rendant difficile l'essai de nouveaux médicaments. Récemment, une technique révolutionnaire permettant d'inactiver très précisément n'importe quel gène du génome a été développée, appelée technique CRISPR/Cas9 et communément désignée sous le terme de "ciseaux moléculaires". Applicable aussi bien sur des lignées de cellules cancéreuses que sur des cellules dites primaires (humaines ou murines), elle offre la possibilité de tester rapidement le rôle de gènes particuliers que ce soit dans la promotion des cancers, ou dans leur capacité à freiner leur développement.

Les modèles *in vitro* ne permettent néanmoins pas d'évaluer la biologie exhaustive, la complexité des interactions entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement ainsi que la réponse au traitement de façon fiable. Seule la confirmation *in vivo* sur des modèles murins peut permettre une validation pour un développement clinique ultérieure. Un modèle très prometteur de souris transgénique a été développé il y a quelques années. Ces souris expriment de façon constitutive cette protéine Cas9.

Le projet présenté ici vise à utiliser ces souris pour inactiver *ex vivo* certains gènes, notamment P53 dont nous avons montré qu'il contrôle le développement de lymphome T, avant de réinjecter ces lymphocytes T déficients pour P53 dans des souris receveuses dépourvues de lymphocytes T et d'observer le développement de lymphomes T. Si ce modèle est confirmé, nous l'utiliserions dans un deuxième temps pour inactiver d'autres gènes que P53 et observer leur effet sur la vitesse de développement de lymphomes (accélération ou ralentissement). Les gènes dont l'inactivation est responsable d'une accélération du développement de lymphome sont dits suppresseurs de tumeur, et permettent de comprendre la physiopathologie de la maladie. Les gènes dont l'inactivation est responsable d'un ralentissement du développement de lymphomes sont dits pro-oncogéniques et constituent des cibles thérapeutiques prometteuses dans la maladie.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum tout en permettant une interprétation formelle des résultats d'un point de vue statistique. Des points limites ont été mis en place pour interrompre le projet si le bien-être de l'animal est compromis.

Les souris seront anesthésiées par isofluorane. Par la suite, les animaux seront observés une fois par semaine jusqu'à S10 puis un jour sur deux jusqu'à l'apparition de signes de développement d'un lymphome, afin de surveiller l'apparition de toute souffrance. En cas de prostration de souris à l'ouverture de la cage ou d'apparition d'un pelage hirsute, les souris seront euthanasiées.

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

7440 L'obésité et le diabète de type 2 sont des pathologies métaboliques humaines en pleine expansion et il est important d'en comprendre les mécanismes physiopathologiques afin de proposer des solutions thérapeutiques efficaces. Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin d'avoir un modèle murin intégré qui permet d'étudier le métabolisme.

Au cours de ces dernières années, la régulation de la masse musculaire est apparue comme un élément important dans le contrôle du métabolisme et le récepteur nucléaire PXR (pregnane X receptor) pourrait jouer un rôle dans le contrôle de la masse musculaire. En effet, les souris invalidées dans tous les tissus pour PXR présentent une masse musculaire plus développée que les souris contrôlent, une résistance à la prise de masse grasse et aux dérèglements métaboliques lorsqu'elles

sont nourries avec un régime hyperlipidique et des taux plasmatiques très élevés d'un facteur intestinal X. Ce dernier est connu dans la littérature pour diminuer les altérations métaboliques induites par les régimes hyperlipidiques. *In vitro* et *in vivo* il a été démontré, par la suite, que ce facteur intestinal X est capable d'hypertrophier les cellules musculaires.

Par conséquent, l'objectif original de ce projet est de mettre en lumière le lien entre l'absence de PXR au niveau intestinal, l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion du facteur intestinal X, l'hypertrophie musculaire et la résistance au développement des altérations métaboliques sous régime standard et hyperlipidique. Pour répondre à nos objectifs, nous utiliserons des souris mâles porteuses de mutation pour le gène pXR qui seront soumises pendant 16 semaines à une diète standard (SD) ou enrichie en lipides (HDFD) afin d'étudier les répercussions sur la masse musculaire et le développement de l'obésité et des troubles métaboliques associées à la diète hypercalorique.

L'utilisation d'animaux est nécessaire pour déterminer les liens entre l'absence de PXR au niveau intestinal, l'augmentation de la synthèse et de la sécrétion du facteur intestinal X, l'hypertrophie musculaire et la résistance au développement de l'obésité sous régime standard et hyperlipidique, car il représente un modèle intégré qui nous permet d'étudier le métabolisme.

Nous utiliserons un total de 120 souris, ce chiffre a été estimé au minimum nécessaire pour satisfaire les analyses statistiques et réaliser l'ensemble des analyses. En accord avec la règle des 3R, les souris seront surveillées tous les 3 jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Chaque souris sera suivie individuellement afin de collecter un maximum de données biologiques et ainsi limiter la quantité de souris au nombre minimum pour assurer des analyses statistiques fiables et interprétables.

7441 Le virus de l'hépatite E (VHE) est responsable chez l'homme d'hépatite aiguë en moyenne plus grave que l'hépatite A. Il s'agit d'un virus zoonotique pouvant être transmis de l'animal à l'homme par la voie alimentaire en cas d'ingestion de produits contaminés crus ou peu cuits. Le porc domestique est un réservoir très important du virus et la contamination tardive de celui-ci (peu de temps avant son abattage) ou de manière prolongée (infection chronique) constitue un risque important de persistance du virus au niveau du foie et donc d'introduction de foies contaminés dans la chaîne alimentaire. Des travaux récents décrivent des dynamiques d'infection très diverses selon les élevages, conditionnées par la conduite d'élevage mais aussi potentiellement par les co-infections intercurrentes. Ainsi des virus immunodépresseurs peuvent entraîner une infection chronique chez le porc. Le circovirus porcin de type 2 (PCV2) est un virus très répandu chez le porc et à l'origine d'une immunodépression. Plusieurs publications rapportent des isolements simultanés VHE/PCV2 à partir de prélèvements de terrain. Cette co-infection semble donc fréquente et entraîne potentiellement une diffusion du VHE dans tout l'organisme du porc comme montré dans des travaux récents. Des travaux préliminaires conduits dans notre équipe montrent une potentielle synergie entre les deux virus aboutissant à une excrétion du VHE plus prolongée que chez des animaux infectés par le VHE seul. Cette co-infection pourrait ainsi expliquer la variabilité observée en termes de durée d'excrétion du VHE, voire une certaine chronicité comme celle décrite chez l'Homme dans un contexte de traitement immunosuppresseur ou d'infections par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH). L'objectif du projet est donc d'évaluer expérimentalement et de manière quantitative l'impact d'une co-infection PCV2 sur la durée d'excrétion du VHE chez le porc (N=44) et son taux de transmission à des porcs sentinelles (c'est-à-dire un échantillonnage d'animaux servant à assurer le suivi sanitaire d'une population animale donnée) sensibles au travers d'expériences de transmission en population co-infectée PCV2 comparée à une population infectée VHE seul. Les expérimentations ne peuvent se faire sans le recours à l'expérimentation animale. A l'issue de l'expérimentation, les porcs seront anesthésiés puis euthanasiés. Tous les prélèvements réalisés seront analysés. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de l'éthique et du bien-être des animaux, en particulier le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention d'estimations de paramètres de transmission précises. Les porcs seront hébergés dans des animaleries de niveau de biosécurité A3 sous filtration d'air, dans des parcs collectifs de 6 porcs. Les parcs contiennent matériaux d'enrichissement du milieu. Le suivi des animaux implique une visite quotidienne voire bi-quotidienne à la suite de l'inoculation. Au cours de ces visites, les animaliers procèdent à un examen clinique des animaux ainsi qu'à une prise de température rectale individuelle systématique.

7442 La production d'anticorps monoclonaux est un service proposé par notre société.

La méthode de première intention pour la production d'anticorps monoclonaux est la méthode *in vitro*. Cependant certaines cellules productrices d'anticorps ne sécrètent pas ou que très peu dans un système *in vitro*. Dans ce cas, nous devons avoir recours à une production *in vivo* : la production en liquide d'ascite chez la souris. La production d'anticorps monoclonaux en liquide d'ascite chez la souris est une méthode classique qui permet d'obtenir des solutions concentrées en anticorps là où la production *in vitro* n'est pas efficace.

Cette méthode consiste à injecter les cellules sécrétrices d'anticorps (hybridomes), ce qui provoque le développement d'une ascite (une accumulation de liquide riche en anticorps dans la cavité péritonéale). Après un laps de temps de 7 à 14 jours les souris sont euthanasiées et le liquide d'ascite (qui contient les anticorps) est prélevé.

Cette méthode permet d'obtenir des solutions beaucoup plus concentrées en anticorps que les méthodes *in vitro*. Cependant la phase d'amorçage, l'accumulation de liquide d'ascite, éventuellement la formation de tumeurs solides causent une contrainte pour l'animal qui peut être intense. En conséquence de quoi le recours à la méthode *in vivo* n'est utilisé que lorsque les méthodes alternatives sont inefficaces.

Afin de limiter au maximum la douleur et la souffrance des animaux, nous avons pris le parti de suivre une procédure qui minimise autant que possible ses conséquences sur les animaux, dans un laps de temps le plus court possible, utilisant le moins d'animaux possible. De plus un suivi strict des animaux est mis en place.

Ainsi, nous prévoyons d'utiliser 6000 souris/an, nombre adapté pour produire plusieurs anticorps monoclonaux différents.

7443 85% des tumeurs humaines sont causées par la transformation maligne de cellules épithéliales induite par la dérégulation d'oncogènes et de gènes suppresseurs de tumeurs. Le phénotype tumoral est caractérisé par l'altération de l'architecture cellulaire, une augmentation de la migration et la résistance à l'apoptose des cellules tumorales. Toutes ces lésions aboutissent au développement de métastases. Le cancer du sein est un problème de santé publique et la protéine ErbB2, un récepteur à activité tyrosine kinase est surexprimé dans 25% des cas, évènement moléculaire associé à un mauvais pronostic. Le tissu mammaire est constitué d'un arbre épithélial entouré par un stroma fibro-adipeux. Il se développe sous l'influence d'hormones lors de la vie reproductive et présente une organisation structurée et fortement polarisée au niveau cellulaire. Erbin est une protéine échafaudage cytoplasmique impliquée dans le maintien de la polarité des tissus épithéliaux. Erbin interagit avec ErbB2 et est nécessaire à son activation oncogénique.

Le but de ce projet est d'étudier la fonction d'Erbin durant le développement mammaire et à mieux comprendre son rôle dans l'oncogenèse mammaire induite par la surexpression d'ErbB2 à l'aide de modèles murins uniques créés au laboratoire. Cela nécessite l'utilisation d'animaux afin de mieux appréhender la complexité tissulaire et notamment les interactions entre tissu épithélial et stroma ainsi que l'influence hormonale. Par conséquent, les approches substitutives *in vitro* ne sont pas adaptées. Nous allons utiliser une lignée de souris déficientes pour Erbin pour étudier le rôle d'Erbin dans la physiologie de la glande mammaire (mammogenèse et lactogenèse) ainsi qu'une lignée de souris déficientes pour Erbin et sur-exprimant ErbB2 pour comprendre le rôle d'Erbin sur le plan physiopathologique. Les expériences nécessaires pour répondre à ces 2 objectifs utiliseront 880 individus au total des 2 lignées de souris. Afin de respecter au mieux les exigences de remplacement, réduction et raffinement, les procédures expérimentales tiendront compte du bien-être animal, de la définition de points limites et utiliseront la statistique pour réduire le nombre d'animaux en obtenant des résultats significatifs. Des mesures antalgiques seront utilisées (anesthésie induite à l'isoflurane).

7444 La radiothérapie classique à l'aide de rayons X, bien qu'utilisée à grande échelle, montre des limites notamment en terme d'effets secondaires importants, ainsi que par l'induction de cancers secondaires chez les patients qui ont été traités plusieurs dizaines d'années auparavant (chez les enfants notamment), ou encore par la diminution de la qualité de vie. En réponse à ces limites, le traitement de patients cancéreux à l'aide d'un faisceau de particules positives (protonthérapie, si on parle de protons uniquement) se développe dans le monde. En effet, les protons ont une façon très différente

de déposer leur dose dans la matière. Le proton s'arrête dans la matière à une profondeur qui dépend précisément de son énergie, et l'essentiel de la dose est déposée dans les derniers millimètres de la trajectoire, proche de l'endroit où le proton s'arrête. A l'heure actuelle, dans le monde, plus de 85 000 patients ont été traités à l'aide de faisceaux de protons. Cependant, il existe encore des cas de tumeurs « radiorésistantes », tant chez l'enfant que chez l'adulte, ou difficile à cibler à cause de la proximité des tissus sains. De par la nature physique des rayons X, une escalade de dose par radiothérapie externe classique n'est pas envisageable chez ces patients. La protonthérapie permet de contourner le problème par un meilleur ciblage de la tumeur, augmentant ainsi la dose dans la tumeur tout en préservant les tissus sains à la fin du parcours des protons et donc limitant les dommages collatéraux. De plus, augmenter l'efficacité biologique des radiations ionisantes (en RX ou en proton) et, par ce fait, augmenter les chances de curabilité apporterait un bénéfice important au patient. Ce projet s'inscrit dans ce contexte. Il s'agit de développer deux assemblages spécifiques composés d'une nanoparticule d'or (Au) couplée à un anticorps qui ciblerait plus spécifiquement la tumeur avec 2 modalités d'administration, une injection directement dans la tumeur et une par voie intraveineuse. Lors de la radiothérapie externe cet assemblage produira une émission de rayonnement secondaire qui déposeront leur énergie localement dans la tumeur. L'objectif final est de pouvoir l'injecter chez l'homme et d'exploiter cet effet radiosensibilisant avec une irradiation proton (5 Gy).

Dans cette étude 91 souris seront utilisées.

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

- Réduire : Nous n'utiliserons que 7 animaux par groupe, 7 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité interindividuelle. Nous utiliserons le test statistique ANOVA, adéquat pour les petits effectifs.

- Raffiner : Nous allons enrichir l'environnement des animaux et mettre en place un suivi des animaux afin de vérifier quotidiennement s'ils ne montrent pas de signes de souffrance. Les animaux porteurs de tumeurs seront euthanasiés avant d'atteindre le point limite. L'irradiation proton à la dose utilisée (5 Gy) n'induit pas d'effets secondaires chez la souris. Aucune atteinte de la peau (rougeur, brûlure) n'a été observée sur les souris irradiées à des doses supérieures (20 et 30 Gy) lors des études précédentes. Toutefois, les souris seront observées avec attention après la séance d'irradiation afin d'observer d'éventuels effets secondaires. En cas de brûlure, application de biafine sur la zone lésée et un conseil sera demandé au vétérinaire référent. - Remplacer : Des tests *in vitro* préalables ont été réalisés mais l'objectif de ce travail étant de montrer les effets potentialisant de l'irradiation proton sur la croissance tumorale, elle ne peut se faire que sur des animaux

7445 La radiothérapie classique à l'aide de rayons X, bien qu'utilisée à grande échelle, montre des limites notamment en terme d'effets secondaires importants, ainsi que par l'induction de cancers secondaires chez les patients qui ont été traités plusieurs dizaines d'années auparavant (chez les enfants notamment), ou encore par la diminution de la qualité de vie. En réponse à ces limites, le traitement de patients cancéreux à l'aide d'un faisceau de particules positives (protonthérapie, si on parle de protons uniquement) se développe dans le monde. En effet, les protons ont une façon très différente de déposer leur dose dans la matière. Le proton s'arrête dans la matière à une profondeur qui dépend précisément de son énergie, et l'essentiel de la dose est déposée dans les derniers millimètres de la trajectoire, proche de l'endroit où le proton s'arrête. A l'heure actuelle, dans le monde, plus de 85.000 patients ont été traités à l'aide de faisceaux de protons. Cependant, il existe encore des cas de tumeurs « radiorésistantes », tant chez l'enfant que chez l'adulte, ou difficile à cibler à cause de la proximité des tissus sains. De par la nature physique des rayons X, une escalade de dose par radiothérapie externe classique n'est pas envisageable chez ces patients. La protonthérapie permet de contourner le problème par un meilleur ciblage de la tumeur, augmentant ainsi la dose dans la tumeur tout en préservant les tissus sains à la fin du parcours des protons et donc limitant les dommages collatéraux (déficit de croissance par exemple). De plus, augmenter l'efficacité biologique des radiations ionisantes (en RX ou en proton) et, par ce fait, augmenter les chances de curabilité apporterait un bénéfice important au patient. Ce projet s'inscrit dans ce contexte. Il s'agit de développer un assemblage spécifique composé d'une nanoparticule d'or (Au) couplée à un anticorps qui ciblerait plus spécifiquement la tumeur. Lors de la radiothérapie externe cet assemblage produira

une émission de rayonnement qui déposeront leur énergie localement dans la tumeur. L'objectif final est de pouvoir l'injecter chez l'homme et d'exploiter cet effet radiosensibilisant avec une irradiation proton (5 Gy).

Dans cette étude 56 souris seront utilisées. Afin de respecter la règle des 3 R, nous utiliserons 14 souris par groupe, ce qui permettra de réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus. Les animaux seront placés à plusieurs par cage et leur environnement enrichi avec des tubes en PVC. Les animaux seront quotidiennement surveillés et mesurés à l'aide d'une grille d'évaluation (état de stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc). Les souris seront prises en charge selon le score obtenu, avec euthanasie si atteinte des points limites terminaux (par exemple perte de poids limite, de mobilité ou dépassement du volume tumoral limite). Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées. Des tests *in vitro* préalables ont été réalisés mais l'objectif de ce travail étant de montrer les effets potentialisant de l'irradiation proton sur la croissance tumorale, elle ne peut se faire que sur des animaux.

7446 Les gliomes ou tumeurs gliales sont l'ensemble des tumeurs cérébrales, bénignes ou malignes. Ils représentent près de 80% de l'ensemble des tumeurs malignes primaires du cerveau et du système nerveux central. Ce sont des tumeurs rares (incidence de 8/100000 habitants/an) mais conduisant à une perte d'années de vie plus importante que n'importe quel autre type de tumeur. Alors que les tumeurs bénignes peuvent généralement être guéries par la chirurgie, tous les autres gliomes peuvent être considérés comme incurables.

Les traitements consistent en premier lieu à effectuer une chirurgie lorsque cela est possible, suivie d'une chimiothérapie ou d'une radiothérapie. Cependant, malgré les progrès techniques en matière d'imagerie et de prise en charge thérapeutique, la tumeur réapparaît toujours. Le principal obstacle à la guérison est la migration des cellules tumorales au-delà des limites de tumeurs détectées par des techniques d'imagerie.

Les procédures d'imagerie médicale telles que l'imagerie par résonance magnétique nucléaire (IRM), la tomographie d'émission monophotonique (TEMP) et la tomographie d'émission de positons (TEP) sont des outils diagnostiques de référence. L'imagerie TEP présente de nombreux avantages notamment une sensibilité à l'échelle de la picomole.

Deux molécules sont couramment utilisées aujourd'hui, le F-18 fluorodésoxyglucose (FDG) et le O-(2-18F-Fluoroethyl)-L-Tyrosine (18F-FET) qui a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour des indications de gliomes. La disponibilité d'isotopes innovants ouvre de nouvelles voies comme l'approche théranostique, qui améliore à la fois le diagnostic en utilisant l'imagerie (mieux détecter les berges de la tumeur par exemple) et la thérapie (optimiser les traitements par radiothérapie).

L'objectif de ce travail est de développer de nouvelles molécules couplées à un radioélément, le 18-Fluor ou le 64-Cu, dans une approche théranostique dans des modèles glioblastome chez la souris NMRI nude.

Pour cette étude, 422 souris NMRI nudes seront utilisées.

Réduction : Afin de respecter la règle des 3 R nous utiliserons le nombre minimal d'animaux par groupe nécessaire pour faire des tests statistiques.

Raffinement : Les animaux seront placés à plusieurs par cage et leur environnement sera enrichi avec des tubes en PVC. Les animaux sont observés quotidiennement afin de détecter des signes précoces de douleur (grille de notation de la douleur). Lors des séances d'imageries les animaux sont placés dans une ambiance chauffée jusqu'à leur réveil et les paramètres vitaux sont enregistrés en continu.

Remplacement : L'objectif de ce travail étant de développer de nouvelles sondes radiomarquées pour une meilleure détection des bords de la tumeur, cette étude ne peut être réalisée *in vitro*.

7447 La Dystrophie Myotonique de type 1 (DM1) est une maladie génétique causée par une expansion de triplet CTGn>50 dans la région 3' non codante du gène DMPK, et caractérisée par une myotonie, une faiblesse musculaire progressive, des troubles cardiaques ainsi que cognitifs. Les ARN mutés contenant des répétitions CUG forment des agrégats nucléaires qui séquestrent MBNL1, facteur régulateur de l'épissage alternatif conduisant à des anomalies de maturation de certains ARNs qui

ont montré être responsable de symptômes cliniques comme la myotonie et la faiblesse musculaire. Actuellement il n'existe pas de traitement pour cette maladie.

L'objectif de ce projet est d'évaluer *in vivo* une nouvelle approche pharmacologie pour cette maladie. Une approche de criblage de petites molécules nous a permis d'identifier un composé capable de modifier le dynamisme de formation des agrégats nucléaires d'ANR mutés et également de normaliser certains défauts d'épissage associés à la DM1 dans différents modèles cellulaires *in vitro*. Ce projet vise à évaluer l'efficacité de composé *in vivo* à l'aide d'un modèle de souris transgéniques DM1 exprimant 220 répétitions CTG dans le muscle squelettique.

En conformité avec les exigences de remplacement et la règle des 3Rs, nous avons tout d'abord confirmé et validé *in vitro* l'efficacité du composé à l'aide de modèles cellulaires. Cependant l'évaluation *in vivo* de son efficacité comme approche thérapeutique nécessite d'avoir recours au modèle de souris DM1. Cinquante-quatre souris seront incluses dans le projet. Des conditions d'hébergement avec un maximum de 6 souris associées à un programme d'enrichissement du milieu et de soins appropriés seront mises en place et une attention particulière sera portée pour réduire d'éventuelle douleur, angoisse ou souffrance. Pendant toute la durée de l'expérience, le bien-être des souris sera surveillé quotidiennement. Des modifications importantes de comportement laissant supposer une douleur ainsi qu'une perte de poids de 20% seront considérés comme critères d'arrêt en cours d'expérimentation et conduiront à l'euthanasie des animaux concernés.

7448 La leucémie myéloïde chronique (LMC) est un type de cancer du sang, caractérisé par une production excessive de cellules « myéloïdes » immatures par la moelle osseuse. Ces cellules, normalement à l'origine des futurs globules rouges, globules blancs ou plaquettes sanguines, prolifèrent de façon anormale et excessive en raison d'une anomalie génétique conduisant à la production d'une protéine « tyrosine kinase » dysfonctionnelle.

Le développement d'inhibiteurs de « tyrosine kinase » (ITK) a été une étape clé dans le traitement de la LMC. Toutefois, l'utilisation thérapeutique de ces ITK doit généralement être poursuivie au long cours du fait de la persistance d'une maladie résiduelle. La possibilité d'arrêter définitivement son traitement après une rémission durable est la prochaine révolution attendue par les patients atteints de LMC. Nous postulons que cette révolution est possible si on prend en compte la place du système immunitaire dans la LMC et qu'on puisse le manipuler de manière appropriée au cours du traitement de la maladie par les ITK. Pour cela, nous devons identifier la nature des cellules immunitaires aux vertus anti-leucémiques qui devront être ciblées et valorisées, en prenant bien sûr en compte leur probable défaillance chez les patients au diagnostic.

Nous avons ainsi identifié une nouvelle population immunitaire dont les fonctions sont conciliables avec des propriétés anti-tumorales. De manière remarquable, ces cellules sont déficientes chez les patients au diagnostic puis restaurées en nombre et dans leurs fonctions après traitement par un nouveau médicament, le dasatinib (DASA), qui est un ITK de seconde génération très puissant et efficace dans la LMC.

L'objectif global de ce projet consiste donc à étudier les mécanismes d'action du DASA pour valoriser cette nouvelle population cellulaire et déterminer dans un modèle animal murin ses qualités anti-tumorales en lien avec une autre population immunitaire déjà décrite pour ses propriétés anti-tumorales. Nous rechercherons une signature spécifiquement anti-leucémique de ces cellules générées chez les patients en rémission sous traitement par le DASA.

En parallèle, dans le but d'apporter la démonstration d'un rôle anti-leucémique de ces cellules, nous exploiterons un modèle de LMC chez la souris que nous avons développé pour étudier le système immunitaire au cours de la maladie.

Enfin, nous modéliserons *in vitro* chez l'Homme et la souris ainsi qu'*in vivo* chez la souris les effets du DASA sur le compartiment cellulaire étudié, tant sur le plan numérique que fonctionnel.

La présente demande d'autorisation concerne une première étape de ce projet global. Au cours de cette première étape, nous aurons deux objectifs principaux :

- Objectif 1 : déterminer, chez des souris saines, la durée et la dose optimale de traitement par le DASA, afin d'induire la prolifération de la population cellulaire étudiée.

- Objectif 2 : déterminer, dans un modèle expérimental de LMC chez la souris, le rôle anti-leucémique du DASA (au temps et à la dose déterminée dans l'Objectif 1 de la présente demande) et déterminer le rôle des cellules étudiées dans ce processus.

Pour mener à bien ces deux objectifs, nous avons pris en compte la règle des 3R.

Notre étude s'inscrit dans un projet à grande échelle impliquant à la fois des patients et une expérimentation sur animaux. Les exigences de remplacement ont été évaluées. Toutefois, afin de générer des résultats probants et significatifs, nous avons besoin de nous placer dans un modèle de LMC intégré à un système immunitaire complet et mature, qui ne peut être atteint qu'en travaillant sur l'animal complet et pas uniquement sur des modèles cellulaires *in vitro*. Ainsi, le choix de l'espèce murine *Mus musculus* nous apparaît comme un compromis raisonnable permettant d'intégrer nos exigences (induction de la LMC et système immunitaire mature), tout en considérant d'autres paramètres (hébergement, coût.) par rapport à des modèles intégrés plus grands (rat ou porc par exemple). De plus, selon les résultats de nos premières expérimentations, nous pourrions être amenés à utiliser des animaux transgéniques uniquement disponibles dans l'espèce *Mus musculus*.

L'objectif 1 permettra de définir les conditions optimales d'administration (durée et dose) du DASA chez la souris et ainsi réduire le nombre d'animaux utilisés ultérieurement dans l'Objectif 2 et les prochaines étapes du projet global. Enfin, dans un souci de raffinement, une attention particulière sera apportée au bien-être des animaux tout au long de la vie de ceux-ci. Les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien de leur état de santé, les conditions d'élevage et d'hébergement seront optimisées (enrichissement du milieu...) et des procédures seront mises en place en cas de problème observé (soins ou euthanasie si un point limite est atteint). Toutes les expérimentations seront de plus réalisées par un personnel compétent et formé à l'expérimentation animale, ce qui permettra ainsi de réduire l'angoisse des animaux et de contribuer à leur bien-être.

Pour ce projet de 5 ans, nous utiliserons un total de 750 animaux. Ce nombre constitue le minimum requis afin de réaliser des analyses statistiques significatives, découlant d'un compromis entre les questions de minimisation du nombre d'une part et l'accès à l'information scientifique d'autre part, et établi selon les expérimentations antérieures publiées par le laboratoire en modélisation des réponses immunes chez la souris.

En conclusion, la présente demande s'inscrit dans un projet global qui, à long terme, permettra de mettre en évidence le rôle anti-tumoral des cellules étudiées chez les patients atteints de LMC. Nous présumons que chez les patients traités par le DASA et chez lesquels il sera observé une génération de ces cellules, associée à une rémission durable, celle-ci pourrait être définitive après arrêt du traitement. Dans ce cas, les patients éligibles bénéficieraient alors d'une meilleure qualité de vie avec à terme un impact social et médico-économique positif.

7449 Notre bureau d'études spécialisé dans les suivis piscicoles en rivières, offre une gamme de services et d'outils permettant de concilier les activités humaines avec les exigences légales en termes de protection de l'environnement. Nous nous appuyons sur une expertise scientifique qualifiée, construite et cultivée avant tout sur le terrain. Notre activité de service conseil offre un accompagnement des projets industriels et des projets de restauration environnementale. Nous avons développé une expertise en suivi de la faune piscicole, autant pour des aspects démographiques que comportementaux. Actuellement, des Directives Européennes imposent aux états membres de l'UE des objectifs ambitieux en termes de restauration de la continuité écologique. Il s'agit concrètement d'aménager les rivières pour permettre aux poissons de franchir les ouvrages à la montée comme à la descente. Dans ce cadre, nous proposons notre expertise et des outils particulièrement innovants pour valider l'efficacité et l'attractivité des échelles à poissons construites en nombre ces dernières années.

La télémétrie adaptée au suivi piscicole est un outils maîtrisé et utilisé par nos biologistes. Le but est de suivre individuellement les déplacements des poissons préalablement marqués. Ainsi, il est notamment possible d'étudier l'efficacité des échelles à poissons, la fréquentation d'habitats récemment restaurés (frayère, zone de repos, etc.) ou encore le comportement à proximité d'un barrage. Des antennes couplées à des récepteurs sont placées sur les sites d'étude afin d'enregistrer en continu les mouvements des poissons.

Nos activités demandent donc de réaliser des marquages de poissons et d'effectuer des actes chirurgicaux sous anesthésie. C'est pourquoi, nous réalisons aujourd'hui cette demande d'autorisation de projet.

Pour exemple, voici ci-après la justification scientifique des études prévues en 2017 :

Etude 1 : Il s'agit de tester l'efficacité de passes à poissons de montaison pour le franchissement des espèces piscicoles. Pour cela, nous proposons de mettre en œuvre un suivi par télémétrie RFID pendant une période d'un an. 9 espèces sont ciblées pour cette étude : gardon, anguille, brème, perche, brochet, carpe, carassin, tanche et rotengle. Le nombre d'individu à marquer s'élèvera à 30 par espèce soit un total de 270 individus. Les PIT TAGS utilisés mesurent 12 mm * 2,12 mm (taille des poissons < 200 mm), 23 mm * 3,85 mm (200 mm < taille des poissons < 400 mm), ou 32 mm * 3,85 mm (taille des poissons > 400 mm).

Etude 2 : L'objectif de cette étude est d'étudier le comportement des anguilles argentées. Il s'agit de mettre en place un suivi automatisé permettant de contrôler les déplacements au niveau de plusieurs vannages, notamment d'identifier les voies de migration et d'évaluer les taux d'échappement. Pour cela, nous proposons de mettre en œuvre un protocole de suivi par télémétrie RFID. Le nombre maximal d'anguilles à équiper d'un Pit-Tag est de 200. Les PIT TAGS utilisés mesurent 32 mm * 3,85 mm.

Etude 3 : L'étude a pour objectif d'étudier le comportement de la truite fario en période de reproduction. Elle porte plus spécifiquement sur : les échanges entre les rivières, l'identification de sites de reproduction, l'attractivité de la zone restaurée pour la truite en période de reproduction, l'origine des poissons fréquentant le site restauré, le comportement des poissons au sein du site restauré, le devenir des poissons fréquentant le site restauré. Pour cela, nous proposons de mettre en œuvre un protocole de suivi par radiopistage. Le nombre maximal de truites à équiper d'un émetteur radio est de 50. Les émetteurs radio utilisés pèsent 4 g pour une longueur de 26,5 mm et une largeur de 10 mm.

Le nombre maximum de poissons qui seront utilisés s'élève à 520.

Remplacement : nous intervenons sur les espèces pour lesquelles ses clients ont identifié un besoin de connaissances. Il s'agit régulièrement des espèces cibles des rivières étudiées.

Réduction : Pour ses études, nous choisissons de limiter au maximum le nombre d'individus à équiper mais un minimum de 30 individus par espèces est requis pour des questions de robustesse des analyses statistiques.

Raffinement : Les poissons sont maintenus dans des conditions de stabulation appropriées (grand volume d'eau, aération permanente, abris, etc.). Les opérations sont toujours réalisées sous anesthésie afin de réduire la douleur.

Nos biologistes sont docteurs en ichtyologie et titulaire des formations réglementaires « expérimentation animale niveau I » et « chirurgie Poissons ».

7450 Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic (tests divers) et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération récente de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non-soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature.

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylé. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire.

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'AcM 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 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues et optimales.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (on ne peut faire *in vitro* la production des anticorps en question), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole en fonction des besoins, ni trop, ni trop peu) et Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : nous n'utiliserons pas d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x 10).

Le temps minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir été en période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Le bien-être des animaux sera surveillé tous les jours (y compris le 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 socialisation.

7451 De nombreuses circonstances nécessitent d'administrer des produits anti-inflammatoires chez le chat afin de lutter contre la douleur, la fièvre et/ou un phénomène inflammatoire. La recherche tente de développer de nouveaux anti-inflammatoires pour une meilleure prise en charge des animaux.

Le but de ce projet est donc de tester en conditions réelles l'effet antalgique (contre la douleur), antipyrétique (contre la fièvre) and anti-inflammatoire de différents traitements. L'inflammation, l'hyperthermie et la douleur seront induites par une injection sous cutanée d'une solution de Kaolin au niveau d'un membre de l'animal. L'effet du kaolin est un effet réversible avec une durée d'action de 5 à 10 jours. L'efficacité des traitements sera évaluée sur différents critères : évolution de la température rectale, boiterie, douleur à la palpation, test de locomotion, volume de la patte et/ou mesure de la force d'appui.

Un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier le produit.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales dont l'administration de kaolin, l'administration du produit à tester et des prélèvements sanguins répétés afin de suivre la pharmacodynamie et pharmacocinétique des produits administrés. Seuls des chats seront utilisés. L'administration de Kaolin se fera sous anesthésie générale et le nombre de prélèvements sanguins sera toujours réduit au minimum.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés en individuel. L'hébergement des animaux est conforme au plan d'hébergement et également conforme au programme d'enrichissement (présence de jouets dans les boxes.).

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique.).

Le nombre d'animaux par étude sera réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet lié à la variabilité interindividuelle. Au total, 150 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

7452 Les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique, sont des maladies complexes et multifactorielles affectant le tractus gastro-intestinal et dont la physiopathologie n'est que partiellement élucidée. Le nombre de patients atteints par ces maladies augmentant, de nombreux traitements ont été mis en place (ex : glucocorticoïdes, immunosuppresseurs). Cependant, ces traitements possèdent d'importants effets secondaires et peuvent aussi se révéler inefficaces chez un grand nombre de patients.

D'autres voies thérapeutiques font donc l'objet de recherches. Il a été montré que l'activité de certaines protéases (enzyme qui clive les liaisons peptidiques des protéines) présentes au sein de la muqueuse intestinale augmentait chez les patients et que cette hyperactivité favorisait le maintien de l'inflammation dans la muqueuse. Au vu de ces observations, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases appelés serpins semble être une approche thérapeutique à exploiter. Dans un projet précédent, notre équipe a testé chez un modèle murin de colite aiguë (modèle d'inflammation du côlon, le plus utilisé pour l'étude *in vivo* des maladies inflammatoires de l'intestin) l'effet anti-inflammatoire de dix serpins produites par des bactéries intestinales. Plusieurs de ces serpins ont montré une action anti-inflammatoire significative.

Le but du nouveau projet est de valider chez un modèle murin de colite chronique le potentiel anti-inflammatoire des 3 serpins qui se sont montrées les plus efficaces dans le modèle de colite aiguë. En fonction des résultats, de nouveaux médicaments à base de ces molécules pourraient être développés pour traiter les maladies inflammatoires de l'intestin.

Le modèle de colite chronique induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des maladies inflammatoires de l'intestin

observées chez l'homme (augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, symptômes cliniques tels que le sang dans les selles...). Ceci explique la forte utilisation de ce modèle dans les études sur ces maladies et sa présence au sein du projet.

Au cours de ce projet, la colite sera induite grâce à la mise en place de 3 cycles d'administration du DSS ((7 jours avec du DSS dans l'eau de boisson suivi de 10 jours sans DSS) X3) et les serpines seront administrées quotidiennement par gavage aux souris. Un suivi clinique journalier des souris sera effectué. Il en découlera un score clinique permettant de déterminer l'intensité clinique de la pathologie. D'autres analyses effectuées sur des échantillons fécaux et sur le côlon des animaux prélevés après leur euthanasie permettront de quantifier l'inflammation d'un point de vue macroscopique et microscopique.

Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer : Des tests préliminaires *in vitro* ont permis de sélectionner des serpines ayant une forte activité anti-protéase. Utiliser uniquement une approche *in vitro* pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir au sein de l'hôte (hormones, système immunitaire entre autres) ce qui induirait un biais expérimental ; de ce fait le recours aux animaux est indispensable.

Réduire : Le projet précédent a permis de tester *in vivo*, dans un modèle murin de colite aiguë, dix serpines sélectionnées sur la base de leur activité anti-protéase *in vitro*. Les trois serpines les plus efficaces dans ce modèle ont été retenues pour les essais du présent projet. Le nombre de souris nécessaire a été défini à l'aide d'études précédentes (celles de la littérature scientifique et les nôtres), mais aussi grâce à un test de puissance, afin d'incorporer dans ce projet un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Cette étude comportera 6 séries permettant de tester chacune 1 serpine, ou une combinaison de serpines. Chaque série sera constituée de 6 groupes expérimentaux de 8 souris conduisant à l'utilisation de 288 souris.

Raffiner : Les souris seront hébergées par 4 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés en continu (température, humidité...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels en carton pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper. Au cours de l'étude, les souris seront examinées individuellement quotidiennement pour établir un score d'intensité clinique de la pathologie permettant de réagir le plus rapidement possible en cas d'inflammation trop invalidante. Aucune médication anti-inflammatoire n'est possible puisque l'inflammation est l'objet de l'étude. La fréquence de change de la litière sera adaptée à la consistance des selles (plus fréquente si selles liquides). Un examen individuel quotidien permettra de déterminer si certains individus atteignent les points limites retenus pour décider d'une euthanasie.

7453 *Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie responsable d'infection pulmonaire grave chez les patients atteints de mucoviscidose et chez les patients en réanimation. Cette bactérie, au gré de successives antibiothérapies, devient résistante à tous les antibiotiques habituellement utilisés. Aussi il est capital de rechercher des alternatives thérapeutiques aux antibiotiques comme les probiotiques. Les probiotiques, parmi lesquels certaines souches de *Lactobacillus*, sont des microorganismes qui, administrés en quantités adéquates, confèrent un bénéfice à la santé de l'hôte.

Dans une étude princeps nous avons montré que l'administration prophylactique respiratoire de souches de *Lactobacillus* issus de lait ou de sujets sains à un groupe de souris dont le poumon est infecté par *Pseudomonas aeruginosa* diminuait de façon significative la charge bactérienne pulmonaire en *Pseudomonas aeruginosa* à 4h post infection par rapport au groupe de souris n'ayant pas reçu les *Lactobacillus*. Ces résultats prometteurs nous ont alors conduits à poursuivre nos expérimentations en l'appliquant au contexte de la mucoviscidose et en sélectionnant des souches de *Lactobacillus* provenant d'échantillons pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose. Ces souches, mieux adaptées à l'écosystème des patients atteints de mucoviscidose, ont permis la formulation de 2 mélanges de *Lactobacillus* sur la base de leur capacité *in vitro* à inhiber la production de 2 facteurs de virulence de *Pseudomonas aeruginosa* : l'élastase et la pyocyanine. L'élastase est une enzyme dégradant certains composés du tissu conjonctif et conduisant à une destruction

tissulaire (en particulier pulmonaire). La pyocyanine est un pigment aux multiples actions parmi lesquelles l'inhibition de la respiration cellulaire ou la mort de certaines cellules du système immunitaire comme les polynucléaires neutrophiles.

-Le premier a été constitué de 3 souches de *Lactobacillus* ayant une bonne activité anti-*Pseudomonas aeruginosa* = mélange *Lactobacillus* Fort.

-Le deuxième a été constitué de 3 souches de *Lactobacillus* dénuées d'activité anti-*Pseudomonas aeruginosa* = mélange *Lactobacillus* Faible.

Ces souches ont été instillées par voie intra-nasale de manière prophylactique avant l'infection pulmonaire à *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous avons alors observé une diminution significative de la charge bactérienne pulmonaire en *Pseudomonas aeruginosa* 24 post infection par rapport au groupe contrôle n'ayant pas reçu de prophylaxie avec des *Lactobacillus*, et ce quel que soit le mélange de *Lactobacillus* administré.

Nous souhaitons maintenant obtenir des données de survie sur ce même modèle.

Le critère de jugement principal sera le pourcentage de souris survivantes 7 jours après l'infection par *Pseudomonas aeruginosa*.

Nous utiliserons 80 souris réparties tel que suit :

- Groupe contrôle *Lactobacillus* Fort : 10 souris
- Groupe contrôle *Lactobacillus* Faible : 10 souris
- Groupe contrôle *Pseudomonas aeruginosa* : 20 souris
- Groupe *Lactobacillus* Fort + *Pseudomonas aeruginosa* : 20 souris
- Groupe *Lactobacillus* Faible + *Pseudomonas aeruginosa* : 20 souris

L'ensemble de ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement. En effet les *Lactobacillus* ont été sélectionnés *in vitro* dans un premier temps et Compte tenu des résultats prometteurs de nos précédentes expérimentations (diminution significative de la charge bactérienne pulmonaire en *Pseudomonas aeruginosa* 24h post-infection des souris ayant reçu une administration prophylactique de *Lactobacillus*), nous souhaitons poursuivre nos expérimentations en enrichissant nos résultats d'une courbe de survie, et donc conserver le modèle animal précédemment utilisé (principe de remplacement), le nombre d'animaux a également été réduit au maximum sans compromettre les objectifs du projet (principe de réduction) et les procédures expérimentales utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible la douleur et/ou l'angoisse des animaux. L'animal est surveillé au minimum deux fois par jour et jusqu'à toutes les heures en fonction de la sévérité des signes cliniques. Lorsque tous les éléments du score sont à leur maximum, ou si le soir l'examen clinique de l'animal montre que celui-ci ne survivra pas à la nuit, les animaux seront euthanasiés. (principe de raffinement).

7454 La maladie de Parkinson est au second rang des maladies neurodégénératives après la maladie d'Alzheimer. En 2015, entre 100000 et 120000 personnes étaient atteintes de la maladie de Parkinson en France avec environ 8000 nouveaux cas par an. Les causes de la maladie demeurent dans la plupart des cas inconnues. La maladie de Parkinson se caractérise par la dégénérescence sélective de cellules nerveuses de la substance noire au niveau cérébral. Son évolution progressive commence avec des symptômes du type dépression, constipation et déficits cognitifs puis devient très handicapante avec l'intensification des symptômes moteurs (difficulté d'initier un mouvement, tremblements.).

Les animaux de laboratoire, en particulier les rongeurs, constituent des modèles d'études prédictifs pour tester l'activité de nouvelles thérapeutiques dans la maladie de Parkinson. L'objectif du présent projet est de développer un modèle induit de la maladie de Parkinson chez la souris et le rat, dans une phase d'évolution très précoce qui se traduit par l'absence de signes cliniques moteurs. Ce modèle permettra ensuite de tester l'efficacité de nouveaux médicaments sur la progression de la maladie lorsqu'ils sont administrés dès les premiers symptômes. Les bénéfices attendus sont considérables car il n'existe pas aujourd'hui de traitement curatif de la maladie. Les procédures mises

en œuvre concernant un nombre réduit de rongeurs et viennent en complément d'informations préliminaires sur l'activité des produits testés obtenues par des tests de pharmacologie *in vitro*.

Il n'est pas possible de remplacer toutes les études d'efficacité *in vivo* dans le traitement de la maladie de Parkinson car elles mettent en œuvre des interactions anatomiques et fonctionnelles seulement présentes dans un organisme vivant complet et essentielles à l'évaluation de l'activité des nouvelles thérapeutiques testées. La réalisation d'études préliminaires d'activité sur des modèles *in vitro* permet de réduire le nombre d'animaux utilisés ultérieurement dans des modèles plus élaborés et cela au travers de la sélection des molécules les plus prometteuses. La réduction s'opère également par le choix des modèles les plus prédictifs ou la variabilité interindividuelle est maîtrisée, autorisant un nombre plus faible d'animaux par groupe. Les procédures sont raffinées par un enrichissement adéquat du milieu (ex : tunnel ou igloo), l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques lors de l'induction de la pathologie et une surveillance particulière des animaux tout au long de l'étude.

Le nombre d'animaux nécessaires pour ce projet est calculé en fonction de la variabilité observée de chaque mesure et de l'effet pharmacologique minimum attendu des produits testés. Un effectif maximum de 1650 souris et 1650 rats sur 5 ans (soit en moyenne 330 souris et 330 rats par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme.

7455 Ce projet a pour but de tester des ingrédients alimentaires d'origine végétale ou des formulations de ces ingrédients afin de mesurer *in-vivo* la vitesse d'hydrolyse de polymères de sucres de différentes natures.

Une dose connue et déterminée à l'avance de ces polymères sera administrée aux rats, un suivi de la cinétique de digestion sera ensuite effectué pendant 120 minutes sur animaux anesthésiés à l'isoflurane.

Les effectifs sont fixés entre 4 et 10 animaux par produit testé. Le nombre maximal de rats utilisés pour ce projet est de 1050. D'après la littérature et notre expérience, cet effectif est suffisant et nécessaire pour s'assurer de la significativité des résultats et pour limiter le nombre d'animaux utilisés. La vitesse de digestion ainsi mesurée pour de nouveaux ingrédients fonctionnels est donc étudiée au travers de ce projet, aucune technique de remplacement n'est donc possible car des phénomènes physiologiques complexes de digestion et absorption sont nécessaires.

Les différentes études incluses dans ce projet pourront permettre d'étudier la vitesse de digestion d'un nouvel ingrédient ou du mélange de nouveaux ingrédients. Ce projet préclinique sur rat nous permettra de vérifier les meilleures doses ou les meilleurs mélanges de nos ingrédients dans le cadre de la recherche sur des ingrédients à faible index glycémique. Ce projet nous permettra de confirmer ou d'infirmer certaines hypothèses avant d'envisager le stade clinique nécessaire à la construction d'un dossier EFSA pour l'obtention d'une allégation santé.

Le stress des changements de cages et des prélèvements est atténué par des manipulations quotidiennes dans un environnement calme. Lors des anesthésies et mesures de glycémie, les animaux sont amenés un par un en salle expérimentale pour éviter que l'animal, sente ou entende ce qui se passe dans la salle. La prévention de la douleur est réalisée de la manière suivante : les animaux de ce protocole subissent une Anesthésie lourde au pentobarbital domitor et au clorketam et ne seront pas réveillés après la procédure. Néanmoins, un traitement analgésique en parallèle est prodigué grâce à l'utilisation du Meloxicam.

7456 Parmi les différentes pistes de recherche actuellement étudiées dans le cadre de l'amélioration de la durée de vie et de la qualité celle-ci, l'autophagie, un mécanisme utilisé par le corps pour détruire les cellules, semble prometteur.

En effet, de récentes études ont mis en évidence que l'autophagie ciblait de manière plus spécifique les cellules abimées et pourrait constituer un mécanisme permettant le maintien en bon état des tissus, notamment musculaires mais aussi de l'activité métabolique au cours du vieillissement.

Notre étude vise à déterminer l'effet d'un activateur de l'autophagie développé par notre partenaire en interaction avec différents régimes alimentaires, sur plusieurs paramètres évoluant lors du vieillissement (force musculaire, métabolisme, endurance, marqueurs sanguins.).

L'impact du régime alimentaire sera notamment étudié par 3 régimes contenant des quantités et des qualités différentes de protéines, composant principal des fibres musculaires.

3R :

Remplacement : ce projet cible un mécanisme complexe qui ne peut à l'heure actuelle pas utiliser d'autres modèles d'études.

Réduction : les effectifs de ce projet ont été établis pour utiliser un minimum d'animaux tout en permettant d'obtenir des conclusions fiables sur l'ensemble de la durée du projet.

Raffinement : Les procédures expérimentales, ainsi que la voie d'administration (eau de boisson) ont été sélectionnées afin d'éviter toute souffrance aux animaux durant l'ensemble du protocole

Cette étude dans son ensemble utilisera 105 animaux, répartis en 7 groupes de 15 animaux, permettant de tester trois régimes alimentaires différents, avec ou sans activateur de l'autophagie.

Elle sera étalée sur une période de 6 mois, en démarrant avec des souris adultes d'environ 18-20 mois pour se terminer chez des souris âgées de plus de 24 mois.

7457 Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le principal agent impliqué dans les pathologies respiratoires des jeunes bovins. Il s'agit d'une affection particulièrement contagieuse qui touche la presque totalité des jeunes bovins de moins de 1 ans et qui favorise la survenue d'infections bactériennes ce qui conduit fréquemment à l'usage d'antibiotiques en élevage. Il existe déjà des vaccins commercialisés contre le VRS bovin mais leur efficacité est limitée et ils n'empêchent pas la dissémination du virus au sein du troupeau.

Les enjeux majeurs en vaccination contre le VRS sont d'obtenir une immunité protectrice de longue durée qui bloque la propagation du virus en élevage et qui permette de faire la différence entre des animaux infectés et des animaux vaccinés (vaccin DIVA).

Dans le cadre de ce projet, nous allons évaluer deux nouveaux candidats vaccins, l'un inerte, l'autre vivant atténué, en les comparant à un vaccin commercialisé. Une efficacité à court terme des deux candidats vaccins a déjà été montrée expérimentalement chez le veau. L'enjeu de ce projet sera de démontrer que la protection conférée par la vaccination perdure pendant plusieurs mois et est meilleure que celle du vaccin commercial.

Le veau est l'hôte naturel du VRS bovin et présente des signes cliniques lors de l'infection. Evaluer un candidat vaccin dans l'espèce cible, avec des conditions représentatives du terrain est un atout majeur pour bien identifier les mécanismes de la protection et être capable de proposer une démarche vaccinale adaptée et efficace.

24 veaux mâles seront utilisés dans ce projet de manière à constituer des groupes homogènes (sur la base de la présence d'anticorps d'origine maternelle transmis par le colostrum) et d'obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les veaux seront suivis tout au long de l'expérience, avec une attention particulière à la qualité de leur alimentation à partir de la naissance (prise de colostrum et de lait maternel avant passage à du lait en poudre et des granulés). Les veaux pourront être traités avec des anti-inflammatoires ou des antalgiques en cas de réaction à la vaccination. Des points limites ont été définis lors de l'épreuve virale et le statut clinique des veaux sera évalué deux fois par jour. Des vétérinaires seront présents pendant la phase d'épreuve virale.

Remplacement : Il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode de remplacement à l'animal entier pour évaluer l'immunogénicité d'un vaccin et sa capacité à protéger contre une épreuve virale Raffinement : La pose de thermobolus ruminants permettra l'enregistrement en continu des températures sans manipulation et stress des animaux ainsi que l'enrichissement adapté des conditions d'hébergement qui concourent au raffinement de l'étude. Réduction : l'expérience d'études antérieures a permis de définir à 6 le nombre d'animaux par lot optimal en fonction des signes cliniques et des lésions attendues

7458 La prise en compte du bien-être animal a conduit la filière porcine à s'engager dans une démarche d'abandon de la castration chirurgicale des porcelets mâles. L'alternative la plus prometteuse est

l'élevage de porcs mâles non castrés sans recours à une technique d'inhibition de l'activité testiculaire. Cependant, ceci soulève plusieurs inquiétudes dont la plus importante concerne la qualité de la viande. En effet, environ 5 à 10% des porcs mâles non castrés présentent des défauts d'odeurs de la viande, communément appelées odeurs de verrat ou odeurs sexuelles. Pour généraliser la production de porcs mâles non castrés, il est donc nécessaire de trouver des solutions pour réduire ce risque et, in fine, produire une viande de bonne qualité organoleptique dans le respect du bien-être des animaux. Deux molécules sont principalement à l'origine de l'odeur de verrat : l'androsténone produite par les testicules et le scatol synthétisé dans l'intestin et dont la dégradation dans le foie serait inhibée par les hormones sexuelles. Des études précédentes suggèrent fortement que la sélection génétique permettrait d'agir efficacement contre l'accumulation d'androsténone dans le gras alors que le problème de du scatol pourrait être résolu en agissant sur les conditions d'élevage des animaux. Cependant la sélection contre l'androsténone pourrait avoir des effets très négatifs sur le potentiel de reproduction des lignées sélectionnées. Pour avancer dans la compréhension des mécanismes génétiques qui expliquent la variabilité de la teneur en androsténone et trouver la bonne stratégie de sélection, il est donc nécessaire de disposer de marqueurs de l'activité testiculaire qui soient facilement accessibles sur les porcs vivants. Nous proposons de rechercher de tels marqueurs dans le plasma des porcs. Pour cela, nous réaliserons des prises de sang à différents âges sur un total de 28 porcs destinés à la production de viande. Nous réaliserons des mesures très poussées sur des marqueurs biologiques présents dans le plasma (hormones et micro ARN) et nous mesurerons la teneur en androsténone et en scatol d'un morceau de gras prélevé sur chaque carcasse à l'abattage. Afin d'optimiser les chances de comparer des porcs avec des niveaux d'odeurs contrastés, nous travaillerons sur deux types génétiques et sur 14 porcs par type génétique. Ce nombre de porcs est calculé en fonction de résultats connus sur d'autres populations de porcs mâles entiers. Cette expérience respecte la règle des 3R puisqu'il n'est pas possible de la substituer par une approche *in vitro*, que le nombre de porcs est minimal et que la procédure de douleur appliquée (une prise de sang) induit une douleur légère qui ne peut pas être réduite.

7459 Parmi les axes de recherche actuels ciblant le cancer, l'immunothérapie est extrêmement porteuse et présente une efficacité marquée sur certains types de tumeurs.

Notre partenaire développe de nouveaux candidats immun thérapeutiques.

Ce projet a pour but de mettre en évidence les effets thérapeutiques de traitements viraux sur des animaux porteurs de tumeurs pulmonaires.

Il s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certaines tumeurs.

Il fait notamment suite à un projet précédent utilisant une voie d'administration différente et ayant révélé des candidats médicaments intéressants que nous cherchons maintenant à développer.

95 souris seront utilisées pour ce projet afin de tester l'efficacité de trois nouveaux candidats thérapeutiques sur le développement d'une lignée tumorale se développant au niveau pulmonaire.

6 groupes d'animaux seront utilisés afin de mettre en évidence l'efficacité d'un traitement permettant de renforcer la réponse immunitaire face à la tumeur.

Les cellules tumorales seront injectées par voie intraveineuse au niveau de la queue.

Le protocole consistera à mettre en évidence sur des souris porteuses de tumeurs pulmonaire l'effet thérapeutique de traitements. Leur état de santé et leur poids constituent des indicateurs pertinents pour définir l'efficacité de ces traitements.

Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré, et pesés 2 fois par semaine.

Des points limites seront appliqués afin d'éviter une souffrance de l'animal pour des motifs liés au poids de l'animal et à son état de santé.

Le nombre d'animaux a été défini grâce aux données préalablement établies sur la croissance du modèle tumoral, mais aussi sur la variabilité possible de l'approche thérapeutique.

Ainsi, les effectifs des groupes ont été adaptés selon les expériences pratiquées. Ainsi pour les groupes fournissant l'information sur la croissance tumorale, 15 à 20 animaux par groupe constituent un minimum acceptable d'un point de vue scientifique tout en se conformant aux principes de réduction liés à l'éthique. Pour les études de culture cellulaire, 5 animaux par conditions sont utilisés. Pour le groupe contrôle, 10 animaux seront utilisés, en effet la variabilité de la réponse est accrue du fait du traitement.

Ce type de protocole ne peut pas être remplacé par une approche alternative n'utilisant pas d'animaux, en effet, le modèle tumoral doit s'implanter dans un organisme vivant complexe, afin d'exprimer l'ensemble des marqueurs et des caractéristiques des tumeurs que l'on cherche à traiter. Des expériences cellulaires ont eu lieu au préalable pour mettre en évidence le potentiel thérapeutique des virus utilisés dans ce projet.

7460 Nous réalisons des Travaux Pratiques auprès d'étudiants inscrits en 3e année à la faculté de Pharmacie.

L'objectif de ces enseignements est d'initier les étudiants à la pratique de l'expérimentation animale dans le contexte de découverte de molécules thérapeutiques.

Les travaux pratiques s'adosent aux cours de Pharmacologie générale et permettent aux étudiants de réaliser des expériences simples de pharmacologie comportementale. Les séances s'étalent sur une période de 2 mois de septembre à novembre, puis durant le mois de janvier de chaque année universitaire. Par an, nous utilisons environ 400 souris et une douzaine de rats (soit 2060 animaux en tout pour 5 ans).

Les expériences sont menées majoritairement sur des souris et exceptionnellement sur des rats (observation de la mobilité, induction de catalepsie sous neuroleptique, induction de stéréotypies sous apomorphine). Les molécules testées sont des molécules de référence utilisées aux doses usuelles (précisées dans le détail des procédures), les tests de comportements mis en œuvre sont très bien décrits dans la littérature, ce qui nous permet de les reproduire en utilisant un nombre réduit d'animaux (groupe de 1 à 2 animaux).

Au cours de ces séances, le bien-être animal est assuré par i) une sensibilisation renforcée auprès des étudiants (introduction aux règles d'éthique en expérimentation animale), ii) une surveillance active par les encadrants formés (3/séances) qui prennent l'initiative d'euthanasier une souris qui présenterait une altération de son état général selon une méthode règlementaire.

Durant le cursus des études de Pharmacie, ces travaux pratiques sont pour les étudiants une occasion unique de travailler sur des modèles *in vivo* ; ils ont donc une place importante dans la formation.

7461 Dans le cadre de la formation en licence de sciences de la vie et en Master "Biodiversité, Ecologie et Evolution" à l'Université, nous mettons en place trois sessions de travaux pratiques (deux en automne et une au printemps) sur la découverte des ectoparasites, des parasites intestinaux et des parasites sanguins du pigeon urbain en relation avec le phénotype (poids, sexe, couleur) et l'environnement (degré d'urbanisation) de celui-ci. L'objectif de ces travaux pratiques est quadruple. Le premier est d'observer la diversité des parasites du pigeon dans différents tissus (plumes, intestin et sang) et leurs cycles de vie. Le deuxième est fondamental et vise à faire comprendre aux étudiants le rôle des facteurs phénotypiques et environnementaux sur les paramètres épidémiologiques (prévalence et intensité). Le troisième vise à leur apprendre à manipuler et à mesurer des vertébrés vivants ainsi que de réaliser une prise de sang sur ce vertébré. Le quatrième est de les sensibiliser à l'éthique en expérimentation animale en leur enseignant les rudiments en éthique animale (les 3R, la douleur, les points limites, la législation etc.). Dans ce contexte, les étudiants seront invités à manipuler un pigeon, le peser, lui mesurer les tarsi, l'aile, lui peigner les plumes pour collecter les ectoparasites du plumage, lui prélever une goutte de sang afin d'identifier les parasites sanguins et lui injecter un mitogène en sous-cutané pour mesurer un estimateur de l'immunocompétence. Le nombre d'individus impliqués dans cet enseignement a été réduit au maximum (1 pigeon par binôme) et en mutualisant l'ensemble des effectifs de la promotion afin d'avoir une puissance statistique suffisante ($n = 20$) pour détecter des relations significatives. Le nombre d'animaux qui seront utilisés par an s'élèvera donc à 60 (soit 300 individus sur 5 ans).

Par ailleurs, la capture, le déplacement et la captivité seront effectués de telle sorte à minimiser le stress des individus. Nous utiliserons les cages de capture avec appâtage à l'aide de nourriture (graine de maïs) car elles permettent de minimiser le stress. Les pigeons seront hébergés dans une volière extérieure construite en grillage galvanisé, divisée en 16 compartiments et couverte en partie par un toit en tôle afin que les oiseaux puissent se protéger des intempéries. Chaque compartiment fait 3.10 mètres de longueur, 2 mètres de largeur et 2.40 mètres de hauteur et accueillera un maximum de 12 individus. Le volume de ces compartiments est de 14.88 m³ pour une surface au sol de 6.2 m². La surface au sol représente donc plus de 2 fois la surface recommandée par l'annexe A de la Convention Européenne (3 m² pour 12 individus). De plus, les compartiments sont plus longs que larges, ce qui permet aux individus d'effectuer de brefs vols. Par ailleurs, chaque compartiment est enrichi de 6 nichoirs en bois brut laqué, de 4 perchoirs en bambous d'une longueur totale de 5 mètres, soit plus de 40 cm par pigeon, 1 mangeoire de 60 cm soit 10 cm de mangeoire par pigeon, un abreuvoir d'eau (réservoir de 7 litres) et une baignoire de faible profondeur de 30 cm de diamètre. Tous ces enrichissements permettent de réduire le stress de la captivité pendant tout le protocole.

7462 Le fonctionnement cérébral ainsi que l'ensemble de nos comportements dépendent de la mise en place ordonnée des circuits neuronaux pendant le développement. Des altérations de ces mécanismes, qu'elles soient d'origine génétique ou environnementale, sont en cause dans de nombreuses pathologies neurologiques et psychiatriques, telles que l'autisme, la schizophrénie, ou les pathologies anxio-dépressives. Mon groupe s'attache à caractériser le rôle de la sérotonine pendant la construction des réseaux de neurones. Les neurones sérotoninergiques sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques, dont la perturbation est associée à des pathologies anxieuses dépressives et à l'autisme. Les neurones sérotoninergiques se développent très tôt pendant la vie embryonnaire et peuvent influencer de nombreux processus de développement tels que la prolifération des neurones ou la formation des synapses. Ces circuits sont à leur tour régulés par des cascades génétiques et par l'environnement, en particulier par l'exposition au stress ou à des toxiques. L'objectif de ce projet est d'étudier l'implication de la sérotonine dans la construction et le raffinement des circuits neuronaux, ainsi que l'impact d'altérations de la sérotonine et du stress néonatal sur le développement anatomique, physiologique et comportemental. Nous nous intéressons en particulier à la mise en place du comportement maternel. Pour ces études, nous devons étudier des modèles intégrés allant de la molécule au comportement. La souris est un modèle mammifère de choix du fait de nombreuses souches de souris génétiquement modifiées qui permettent de cibler des neurones spécifiques pour comprendre les mécanismes normaux et pathologiques du développement. Dans notre projet de recherche nous avons sélectionné un nombre restreint de lignées de souris transgéniques (Sert-Cre, Tph2 flox, VMAT2 flox, TdTomato), qui seront utilisées en parallèle de souris de souche sauvage (C57-Black, Balbc, Swiss) provenant de fournisseurs agréés.

Nous anticipons au total l'utilisation de 965 souris pour l'ensemble de ce projet.

Nos protocoles expérimentaux impliquent 1) des observations comportementales, 2) des actes chirurgicaux limités sous anesthésie, 3) des expériences terminales (anatomie, biochimie, cultures primaires de cellules) après euthanasie des animaux.

Mise en œuvre pratique des 3R :

- Réduction

Nous réduisons le nombre d'animaux en combinant plusieurs approches expérimentales sur une même souche. Par ailleurs, pour minimiser la quantité d'animaux produits, nous nous efforçons d'inclure dans une procédure la grande majorité des animaux issus de l'élevage. Ainsi, les couples de reproduction sont choisis de façon à ce que les animaux contrôles proviennent des mêmes portées que les animaux mutants. De même, femelles et mâles sont utilisés : les femelles sont incluses dans les expériences de comportement maternel, tandis que les mâles sont soumis aux expériences d'apprentissage émotionnel. De plus, quand cela est possible, un même animal est utilisé successivement pour des études de comportement, puis pour des études anatomiques ou biochimiques. Enfin, nous optimisons au maximum les données obtenues à partir d'une expérience donnée : par exemple, la réalisation de plusieurs séries de coupes par cerveau nous permet de réaliser plusieurs marquages différents pour un même cerveau.

D'une manière générale, le nombre minimal d'animaux nécessaires à confirmer ou infirmer notre hypothèse de départ, est calculé au plus juste pour chaque expérience (en incluant les groupes contrôles), mais néanmoins suffisants en vue de l'obtention d'une réponse statistiquement valide.

- Raffinement

Les animaux sont maintenus dans un environnement enrichi (maison en carton ou carré de coton pour faire un nid). Les animaux sont en groupe de 3/4 individus, et seules les femelles gestantes ou avec petits sont transitoirement isolées dans des cages. Après un acte chirurgical, la surveillance des animaux est accrue afin de détecter une éventuelle perte de poids ou d'appétit, ou bien un changement de comportement : la cage de l'animal est placée sur une plaque légèrement chauffante et de la nourriture enrichie est proposée. En l'absence de changement dans l'état de l'animal ou en cas de douleur manifeste (critère d'arrêt précoce), l'animal est euthanasié.

Un niveau suffisant d'anesthésie et d'analgésie est maintenu pendant toute la durée de l'acte chirurgical, des anti-inflammatoires et antalgiques sont administrés quotidiennement pendant la période post-opératoire. Il faut noter que la stéréotaxie cérébrale n'est pas douloureuse en elle-même ; seule la peau incisée peut en cas de problème de cicatrisation provoquer des douleurs. En cas de problème de ce type, heureusement très rare, les animaux sont euthanasiés.

- Remplacement

Pour les études *in vitro* de biochimie et de biologie cellulaire, nous utiliserons des lignées cellulaires et des cellules souches embryonnaires afin de limiter le nombre d'animaux. Nous sommes en train de tester des alternatives comme l'utilisation de cellules pluripotentes induites qui peuvent être intéressantes pour tester dans le futur certains gènes candidats, mais qui ne permettront en aucun cas d'appréhender la mise en place des circuits neuronaux intégrés, ni a fortiori d'étudier l'influence de l'environnement sur la maturation des circuits et les interactions maternelles

7463 Le pancréas joue un rôle clef dans l'homéostasie nutritionnelle par la synthèse et la sécrétion d'hormones et d'enzymes. Cet organe inclut des cellules endocrines et exocrines. Le pancréas exocrine se compose de cellules acinaires et canalaire, alors que les cellules endocrines sont regroupées en des îlots de Langerhans. Ces derniers correspondent à des micro-organes spécialisés composés de quatre différents types de cellules : alpha, bêta, delta, et PP produisant les hormones glucagon, insuline, somatostatine et PP (polypeptide pancréatique), respectivement. L'insuline et le glucagon fonctionnent de façon coordonnée pour contrôler l'homéostasie du glucose (ou glycémie), alors que la somatostatine et PP régulent la sécrétion d'autres hormones et d'enzymes exocrines.

Comprendre comment les cellules bêta sont générés au cours du développement, mais aussi à l'âge adulte, est une condition préalable à la conception de nouvelles thérapies de régénération cellulaire dans le contexte de la recherche sur les diabètes de type 1 type 2, deux maladies résultant in fine en la perte ou diminution importante du nombre de cellules bêta. Spécifiquement, notre recherche se concentre sur le diabète de type 1, une maladie auto-immune qui se caractérise par la perte sélective de cellules bêta. Sans traitement, cette condition peut avoir de graves conséquences telles que des dommages vasculaires, des risques de cécité, d'amputation, ou même la mort. Les traitements actuels consistent en l'injection d'insuline exogène pour compenser la déficience en cette hormone. Cependant, les facteurs environnementaux tels que l'exercice, le régime alimentaire, la grossesse, ou l'âge, peuvent provoquer de fortes variations dans les niveaux de glucose sanguin, malgré un traitement à l'insuline, et donc éventuellement conduire aux complications présentées précédemment. La transplantation d'îlots représente un substitut au traitement à l'insuline mais la pénurie de donneurs empêche son utilisation généralisée.

Ainsi, d'autres alternatives doivent être développés afin de traiter efficacement les conséquences du diabète. Nous avons ainsi identifié un gène d'intérêt et avons généré des animaux pour lesquels ce gène est spécifiquement inactivé dans le pancréas (brevet en cours). Ces animaux ne deviennent jamais diabétiques lorsque soumis à différents traitements normalement résultants en un diabète. Il semblerait que ces animaux absorbent moins les sucres que des animaux normaux. Nous souhaiterions le vérifier par des analyses métaboliques. Nous redérivons donc nos animaux pour une entrée dans l'animalerie C3M afin d'effectuer ces analyses (nous ne sommes pas équipés dans notre animalerie).

Nous prévoyons d'utiliser 80 souris pour l'ensemble de ce projet qui répond aux exigences de la règle des 3 R :

Remplacement : les effets métaboliques analysés sur le long terme requièrent un système biologique intégré tel qu'un organisme vivant. Ceci ne peut malheureusement pas être modélisé *in vitro*.

Réduction : Nous utiliserons un nombre d'animaux aussi faible que possible. L'application de tests statistiques nous permettra de réduire le nombre d'animaux au minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs et exploitables et sans prévoir répétition des expériences.

Raffinement : Aucun des animaux utilisés dans ce projet ne présente de phénotype dommageable. Durant toute la procédure, les animaux seront suivis en s'appuyant sur une grille de score permettant d'évaluer et d'objectiver les éventuelles souffrances, et de mettre en œuvre des points limites précoces et adaptés. En amont de la procédure, des dispositions (habituation) sont prises pour minimiser tout stress aux animaux.

7464 Chez l'humain, la vue envoie approximativement 70% des informations que le cerveau perçoit du monde extérieur. Ces informations sont captées par les cellules photoréceptrices de la rétine située au fond de l'œil. Elles initient ensuite une succession de messages électriques qui sont envoyés à travers la rétine, le nerf optique jusqu'au cerveau et créent une image. 285 millions de personnes dans le monde souffrent à des degrés variés de perte de vision jusqu'à la cécité complète. Une des causes importantes est le glaucome, qui est la seconde cause de cécité dans le monde avec plus de 4,5 millions de patients. Sa prévalence est de l'ordre de 5-6% chez les plus de 60 ans. L'incidence du glaucome ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population et on estime que plus de 80 millions de personnes pourraient être atteintes à l'horizon 2020. Le glaucome provoque la mort des neurones ganglionnaires de la rétine dont les prolongements (appelés axones) constituent le nerf optique, l'unique voie de sortie des informations visuelles vers le cerveau. Ainsi, dans le glaucome, la rétine est toujours fonctionnelle mais se retrouve progressivement déconnectée du cerveau. Le dépistage des patients est souvent tardif et intervient alors que la vision est déjà irrémédiablement altérée. Parmi les autres maladies induisant une cécité, les dégénérescences rétinienne ont en commun la dégradation, puis la mort des cellules photoréceptrices de la rétine. Lorsque les cellules photoréceptrices dysfonctionnent, l'image devient floue, distordue ou ne peut plus se former. Ces maladies affectent plus de 170 millions de personnes dans le monde mais pour les mêmes raisons que le glaucome, leur nombre est en perpétuelle augmentation. Les dégénérescences rétinienne les plus connues sont la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et Retinitis Pigmentosa. La complexité de la vision est telle qu'elle ne peut être abordée que chez l'animal vivant. Le modèle souris permet en plus des modifications génétiques permettant d'étudier le rôle d'un gène donné. Lorsque les souris proviennent de l'extérieur, une période d'acclimatation de 5 jours est observée avant de les faire entrer en expérimentation. Tout au long des procédures, les souris de même sexe restent hébergées en groupe.

Le projet vise à mettre au point de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant de régénérer la rétine et ses connexions avec le cerveau. Le nombre total de souris utilisées dans ce projet sera de 806 pour 5 ans et les diverses procédures expérimentales. Nous avons soigneusement choisi les paradigmes expérimentaux pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. En respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R », 1) Lors des procédures, la cage est conservée à l'écart de la table d'expérimentation afin de minimiser le stress de l'animal. Pendant l'expérimentation et jusqu'à leur réveil, la température des souris est maintenue en les plaçant sur un tapis chauffant. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Tous les animaux auront à leur disposition des carrés de cellulose, une maisonnette, des bâtons à ronger ainsi que de la nourriture et boisson à volonté. 2) Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour obtenir des résultats statistiquement interprétables et atteindre objectif scientifique du projet. La plupart du temps, les mêmes animaux sont utilisés dans plusieurs procédures. 3) La complexité de la régénération axonale et de la dégénérescence rétinienne est telle que les études ne peuvent se faire *in vitro*.

7465 La maladie de Lowe est une maladie génétique rare qui affecte une naissance sur 500 000. Cette maladie est caractérisée par des atteintes cérébrales, oculaires et rénales (problèmes de réabsorption rénale puis insuffisance rénale à long terme). Il n'y a pas aujourd'hui de médicaments ou de thérapie génique capable de guérir de cette maladie, les patients décédant d'une insuffisance rénale dans leur 2ème ou 3ème décade. Une autre maladie appelée Dent-2 correspond à une forme moins sévère de la maladie de Lowe, sans les atteintes cérébrales ou oculaires.

La cause génétique de la maladie de Lowe et de la maladie de Dent-2 est connue : il s'agit de l'inactivation du gène codant pour une enzyme appelée OCRL. Cependant, il n'existe pas de modèles animaux simples reproduisant la maladie de Lowe/Dent-2. Un modèle murin (double délétion + transgène) a été généré mais n'est malheureusement plus disponible et nécessite un grand nombre de croisements (et donc de souris) pour pouvoir être mis en œuvre.

L'objectif de ce projet est (1) de développer un nouveau modèle murin de la maladie de Lowe et (2) d'utiliser ce modèle *in vivo* pour tester deux molécules potentiellement thérapeutiques que nous avons identifiées au laboratoire et qui fonctionnent déjà sur des cellules en culture.

Pour cela, nous inactiverons un gène qui code pour une protéine dont on a pu montrer qu'elle permet de localiser et d'activer OCRL dans les cellules. Des collaborateurs ont déjà produit la lignée de souris permettant l'inactivation sélective de cette protéine dans les cellules rénales. Nous testerons si dans ces conditions nous reproduisons la tubulopathie rénale observés chez les patients en analysant les urines. Si le modèle reproduit de façon satisfaisante la maladie, nous injecterons chacune des deux molécules chimiques candidates et testerons si elles ont un effet thérapeutique. Nous utiliserons des doses qui sont déjà connues pour avoir des effets non-toxiques.

Nous prévoyons d'utiliser 120 souris pour valider le modèle de la maladie et au maximum 144 souris pour tester l'effet thérapeutique des deux molécules identifiées, soit 264 souris.

Nous consultons un biostatisticien avant chaque expérience pour être sûrs d'utiliser le nombre minimum d'animaux nécessaire pour atteindre l'objectif fixé. Les expériences nécessiteront des collectes d'urine et des prises de sang qui induisent une douleur légère et de courte durée à l'animal. Les injections ne seront pas fréquentes et seront mises en œuvre dans des conditions strictes pour limiter la douleur. Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

Ces expériences devraient permettre d'établir un modèle murin simple de la maladie de Lowe indispensable pour valider *in vivo* des molécules potentiellement thérapeutiques.

7466 Les cellules souches ont un grand potentiel dans le domaine de la médecine régénératrice et sont d'ores et déjà utilisées dans certaines pathologies. Ainsi ces dernières années de nombreuses banques de cellules souches ont été créées, certaines à visées thérapeutiques, d'autres pour la recherche fondamentale.

Ainsi ces cellules sont destinées à être conservées des dizaines d'années de la naissance d'un individu (moment où sont généralement prélevées les cellules souches) au moment où il tombe malade. Notre projet vise à étudier l'effet du temps et des différents modes de conservation sur l'efficacité de greffe des cellules souches en les greffant et en déterminant quelle(s) condition(s) est/sont les moins délétères.

Outre l'étude cellulaire nous emploierons 3 procédures de greffe afin de déterminer l'efficacité de cette dernière dans les conditions de conservation préalablement définies. Ainsi cela nous permettra d'avoir une approche fonctionnelle, indispensable pour définitivement conclure quant à la nécessité d'appliquer une procédure plutôt qu'une autre.

Nous ferons la majorité des expériences *in vitro*. Cependant les propriétés de prises de greffe et d'automodulation ne sont accessibles que dans un modèle *in vivo*. Il n'existe pas de modèle *in vitro* ni *in silico* aujourd'hui. Nous grefferons des cellules souches hématopoïétiques (qui donnent les cellules du sang) afin de regarder la sortie d'anémie de souris préalablement irradiées ainsi que la colonisation de leur moelle osseuse par le greffon, des cellules souches musculaires afin d'étudier le potentiel de greffe de cet organe et injecterons des cellules souches mésenchymateuses (autre type de cellule souches trouvées dans de nombreux organes) afin de tester leur potentielle utilisation en médecine régénératrice. Nous emploierons le minimum de souris dans chaque cas afin d'avoir des

statistiques suffisamment puissantes et prélèverons un maximum d'organes au moment de la mise à mort afin de ne pas à avoir à répéter les procédures sur d'autres animaux. Un suivi attentif des animaux sera effectué et des antalgiques seront employés. Egalement nous ferons un maximum d'études *in vitro* afin de caractériser plus finement le comportement des cellules souches, ce qui nous permettra d'éviter d'utiliser des souris. Nous utiliserons au total 63 souris mâles âgées entre 6 et 12 semaines dans trois procédures de classe modérée.

7467 La maladie rénale est un problème de santé majeur dans les sociétés occidentales et les estimations récentes suggèrent qu'une personne sur dix souffrira d'une pathologie rénale à un moment dans sa vie. L'unité fonctionnelle à la base de la filtration rénale est le glomérule : cette fonction est assurée par des cellules extrêmement spécialisées, appelées podocytes. Des défauts de fonctionnement des podocytes matures contribuent de façon significative à cette maladie et sont la cause principale d'insuffisance rénale terminale. L'étude et l'identification des processus assurant la fonctionnalité des podocytes, sont donc importantes.

Dans notre laboratoire nous étudions les gènes impliqués dans le bon fonctionnement des podocytes, en particulier le gène *Wt1*. Pendant la formation de l'embryon, *Wt1* est exprimé dans différents types de cellules rénales, tandis que dans le rein adulte ce gène est uniquement activé dans les podocytes. Des mutations dans ce gène sont corrélées à un ensemble de malformations rénales. Deux principaux variant de *WT1* (*WT1 +KTS* et *WT1 -KTS*) ont été identifiés qui se distinguent par des propriétés et des localisations dans la cellule différente. Les protéines *WT1 +KTS* se lient essentiellement aux chromosomes tandis que les *WT1 -KTS* s'associent préférentiellement aux ARNs. L'inactivation de chaque variant pendant la formation de l'embryon conduit à d'importantes malformations rénales et les embryons ne survivent pas après la naissance. Du fait de cette létalité précoce les fonctions respectives de ces protéines dans le maintien des podocytes rénaux au stade adulte n'ont jamais été étudiées et leurs rôles demeurent inconnus.

Dans notre projet, nous allons analyser les fonctions de *Wt1 +KTS* et *Wt1 -KTS* dans le rein adulte *in vivo*. Pour cela nous utiliserons des souris modifiées génétiquement qui recevront un traitement qui fera qu'un seul des variant de *Wt1* (*-KTS* ou *+KTS*) sera produit dans leurs podocytes. Ensuite nous effectuerons deux types d'études avec ces animaux :

1) Nous déterminerons la capacité de chacun de ces variant à maintenir la fonction rénale. Dans ce but nous analyserons les urines de ces animaux afin de suivre leur fonction rénale et détecter le plus tôt possible toute insuffisance rénale qui se caractérisera par une augmentation de la quantité de grosses protéines libérées dans les urines.

2) Nous identifierons sur quelles régions des chromosomes des podocytes ces protéines de *Wt1* se lient et quel est leur effet sur l'activation des gènes. Pour cela, après traitement et avant que les souris montrent un début d'insuffisance rénale, elles seront euthanasiées; leurs reins seront prélevés et leurs podocytes isolés. Ensuite nous identifierons les gènes qui auront été activés par *WT1 +KTS* et *WT1 -KTS*. En parallèle nous déterminerons sur quelles portions de chromosomes des podocytes ces protéines se fixent.

Ces stratégies expérimentales nous permettront d'élucider le rôle spécifique de chacun de ces variant dans le maintien de la fonctionnalité rénale adulte. Dans une perspective de réduire le nombre de souris utilisées, nous optimiserons nos expérimentations et effectuerons plusieurs tests sur chaque échantillon prélevé. De plus nous utiliserons un nombre minimal d'animaux qui nous permettra malgré tout d'obtenir des résultats qui seront statistiquement pertinents (Réduction). Les animaux soumis à expérimentation seront régulièrement surveillés, nous porterons une attention particulière à la survenue de tout phénotype dommageable. En particulier nous arrêterons l'expérimentation avant que toute insuffisance rénale se déclare. Ce point limite nous dictera la fin de notre expérimentation (Raffinement). Le rein est un organe complexe qui possède de multiples fonctions (élimination des déchets, maintien de l'équilibre hydrique, acido-basique et des électrolytes, production d'hormones, enzymes et vitamines). Conséquemment sa structure tridimensionnelle est très complexe et bien définie. De nombreux laboratoires, dont le nôtre, essayent de mettre au point des protocoles de production de reins fonctionnels *in vitro* afin de palier à la pénurie mondiale croissante de ces organes. Bien que de grands avancements aient été réalisés dans ce domaine il reste encore impossible actuellement de reproduire la complexité et la fonctionnalité des reins *in vitro*. De ce fait nous sommes

contraints d'effectuer nos analyses fonctionnelles des podocytes sur des modèles animaux (Remplacement).

Pour ce projet nous utiliserons un nombre total de 162 souris.

7468 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. 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 type2. 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.

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 type2.

Remplacement impossible : Notre objectif est d'étudier les rôles physiologiques des 2 formes d'HNF-4 dans le contrôle de l'homéostasie glucidique et énergétique, ce qui nécessite une approche *in vivo*. Nous déterminerons la masse grasse des animaux ainsi que la dépense énergétique

Les différentes procédures 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 : (1) enrichissement (coton, ou nids et/ou tunnels permettant l'escalade et la cache), acclimatation de 7 jours (2) protocoles de classe légère à modérée ne nécessitant pas d'anesthésie, (3) actes réalisés avec les meilleurs outils et par des personnes formées et habituées à les faire.

Nombre d'animaux expérimentés utilisé pour le projet : 192

7469 Notre but est de comprendre les mécanismes perturbés par les prises répétées de fortes doses d'alcool chez le Rat, en modélisant le "binge-drinking" humain. Chez l'Homme adolescent, cette pratique entraîne des défaillances mnésiques dont les mécanismes sont peu connus. De plus, la sensibilité des femelles au binge drinking par rapport aux mâles est mal documentée, alors que dans la population humaine européenne, le "binge drinking" est pratiqué par les garçons et les filles.

Nous traiterons plusieurs groupes de rats adolescents et adultes, mâles et femelles, avec des alcoolisations « binge drinking » (1 ou 2 fois par jour, éthanol 3 g/kg). Cette administration pourra être répétée jusqu'à 8 jours. Nous réaliserons des études comportementales (tests de mémoire, de dépression et d'anxiété) et des analyses neurochimiques post-mortem sur les cerveaux.

Nous avons tenu compte de la règle des 3 R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Pour réduire au minimum le nombre de rats, les groupes seront constitués de 10 rats pour un groupe expérimental donné. Pour les expériences comportementales de "Reconnaissance d'un nouvel objet", le nombre de rats sera augmenté à n=15 en raison des fortes variabilités interindividuelles. Pour raffiner notre méthodologie, nous incluons des critères d'interruption d'expérimentation. Aucune procédure ne sera susceptible d'induire de la douleur chez les rats. Cependant, en cas de souffrance des rats entraînant un score supérieur à 6, ils seront euthanasiés par CO2 par le personnel de l'animalerie. Les méthodes d'anesthésie et d'euthanasie seront effectuées dans des conditions réduisant au maximum le stress. Les rats seront hébergés par 3 pour favoriser les contacts sociaux et l'environnement sera enrichi (litière foisonnante et tube en carton) afin d'éviter tout stress environnemental. Concernant le Remplacement, il n'existe pas de méthode de substitution aux expériences comportementales (pas de modèle computationnel des symptômes anxio-dépressif, ni de mémorisation d'un nouvel objet).

Pour les aspects neurochimiques, nous ne disposons pas de modèle *in vitro* ou computationnel des mécanismes d'adaptations neuronales induites par le binge drinking dans les régions cérébrales.

Le nombre total d'animaux sera de 800 rats sur 4 ans. Les animaux recevront soit une, soit 2 doses d'alcool par jour à un intervalle de plusieurs heures et nous les étudierons après élimination de l'alcool (à +24h, +48h et +8jours). Nous mesurerons éventuellement l'alcoolémie des rats par prélèvement de sang sur la veine sublinguale, sous anesthésie générale à l'isoflurane. Après les tests comportementaux les rats seront euthanasiés soit par administration d'une dose létale d'anesthésique, soit, après obtention d'une sédation profonde par inhalation d'isoflurane, par décapitation, afin de prélever les cerveaux pour les études neurochimiques.

Nous étudierons la différence de sensibilité à l'alcool entre les sexes et le rôle de la puberté : les tests seront donc effectués en période pré et post pubère. Chez les femelles, nous déterminerons la phase du cycle ovarien par frottis vaginal sous anesthésie pour définir quelle phase est importante dans la sensibilité des femelles au binge drinking. Après détermination de la période critique du cycle, nous ferons les mêmes expériences chez les femelles que chez les males.

7470 Cet enseignement a pour but d'initier les étudiants à l'expérimentation animal et d'appréhender la notion de tolérance au glucose abordée en cours magistral et d'éprouver à l'aide d'un modèle animal simple la fiabilité et la précision des méthodes de diagnostic et de surveillance du diabète avec des analyses statistiques sur ordinateur de données collectées. Cet enseignement a pour but d'explorer l'homéostasie glucidique chez la souris. Plus particulièrement, les étudiants seront amenés à réaliser une épreuve d'hyperglycémie provoquée par voie orale chez des souris rendues préalablement diabétiques par injection de streptozotocine, une drogue qui détruit spécifiquement les cellules bêta du pancréas par nécrose et permettant de créer un modèle de diabète de type 1. Ces techniques sont utilisées couramment en expérimentation animale ainsi qu'en médecine humaine afin de diagnostiquer l'existence d'un diabète. D'un point de vue pédagogique, la streptozotocine est adaptée à une expérimentation courte parce que l'installation du diabète par cet agent est extrêmement efficace et rapide. L'hébergement des animaux sera réalisé selon les normes en vigueur et l'enrichissement du milieu se fera avec du nid végétal.

La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 20 souris par an soit 100 souris au total. Ce nombre, qui prend en compte les exigences de remplacement et de réduction, est incompressible car seules les souris nous permettront de réaliser cette expérimentation. Pour respecter le principe de la règle des « 3R », Seuls des animaux nous permettront d'étudier l'homéostasie glucidique et d'évaluer l'efficacité des méthodes de diagnostic du diabète. 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 avec une surveillance journalière. L'ensemble des expériences est mené par des personnels qualifiés, dans des locaux d'hébergement respectant les standards en vigueur (enrichissement partiel des cages, par exemple). Enfin, des points limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

7471 L'hormone glucocorticoïde (GC) libérée en réponse au stress régule diverses fonctions biologiques importantes (comportement, système immunitaire, métabolisme...) via l'activation des récepteurs aux glucocorticoïdes (GR) - exprimé dans tous les types cellulaires et le récepteur aux minéralocorticoïdes (MR) présent dans quelques types cellulaires. La sécrétion de GC est étroitement régulée par l'axe hypothalamique-hypophyse-surrénalien (HHS) afin d'assurer une orchestration appropriée des réponses de l'organisme par ces récepteurs.

De nombreux travaux, tant dans la recherche clinique que sur des modèles animaux (notamment chez les rongeurs), suggèrent qu'un dérèglement de la réponse au stress et de l'axe HHS est un élément clé de l'apparition des maladies psychiatriques, comme la dépression, les troubles de l'anxiété, l'addiction. Le déclin cognitif est un point commun à l'ensemble de ces pathologies, notre travail en étudie les raisons. Une corrélation entre les taux de GCs et des fonctions cognitives diminuées a été montrée dans plusieurs études. Les mécanismes cellulaires et les circuits neuronaux impliqués dans ce phénomène restent cependant méconnus.

Nous cherchons à comprendre comment les GCs et ses récepteurs agissent sur les fonctions cognitives avec un intérêt particulier pour la mémoire de travail et la flexibilité comportementale. Afin

d'étudier les mécanismes physiopathologiques au travers desquels des taux élevés de glucocorticoïdes ou des dysfonctionnements de leurs récepteurs peuvent contribuer à l'apparition de troubles psychiatriques, nous avons développé une stratégie expérimentale fondée sur l'invalidation conditionnelle du gène GR et de certains de ses partenaires. Pour cela, nous utiliserons des lignées de souris portant des mutations des facteurs de transcription induits par la réponse au stress ou de leurs partenaires. L'invalidation des gènes correspondants sera obtenue en utilisant le système Cre/loxP, la recombinase sera exprimée sous le contrôle d'un transgène ou sera délivrée localement par transduction virale. Les animaux mutants et leurs contrôles seront étudiés en conditions de base ou de stress chroniques. Plusieurs modèles de stress seront comparés : un stress de séparations maternelles, un stress de défaites sociales et un stress chronique induit par des stress légers exercés de façon aléatoire. Ces protocoles classiques sont connus pour perturber l'axe HHS, la neurotransmission et les comportements de types anxieux et dépressifs. Les comportements de types anxieux, dépressifs et cognitifs seront étudiés. Sur les mêmes animaux, des analyses moléculaires et anatomiques nous permettront d'étudier les fondements physiologiques de l'impact du stress sur le comportement.

Ce type d'étude, impliquant le comportement ne peut pas être réalisé sur des modèles alternatifs tels des cultures cellulaires. En accord avec la règle des 3R, le nombre d'animaux par groupe sera réduit au strict nécessaire en terme de puissance statistique. De plus, afin de limiter le nombre d'animaux, plusieurs mesures comportementales seront effectuées sur les mêmes cohortes, lorsque cela sera possible, et les animaux étudiés en comportements seront également utilisés pour les études physiologiques, anatomiques et moléculaires. Concernant le raffinement, les animaux feront l'objet d'un contrôle quotidien enregistré. Ces contrôles permettront d'identifier tout animal malade ou blessé et de prendre les mesures appropriées. De plus, les procédures chirurgicales seront accompagnées de traitements anesthésiques et analgésiques appropriés afin d'éviter toute souffrance excessive. Le nombre d'animaux utilisés dans ce protocole sera de 2240.

7472 L'insuffisance cardiaque est une pathologie sévère caractérisée par une incapacité du cœur à assurer sa fonction de pompe et à irriguer correctement les organes périphériques. Cette déficience est due à des facteurs divers et variés. Ainsi, une diminution des capacités bioénergétiques, une modification des propriétés contractiles, une altération de l'architecture cellulaire du muscle cardiaque lié à une anomalie du cytosquelette conduisent à des phénomènes de remodelage cardiaque (hypertrophie/dilatation) aboutissant dans un deuxième temps à l'insuffisance cardiaque. D'autre part, une altération des propriétés mécaniques des vaisseaux provoquent aussi des altérations de la fonction cardiaque. Au niveau moléculaire, ce phénomène de remodelage est caractérisé par une altération des programmes d'expression des gènes cardiaques avec notamment l'expression de gènes cardiaques fœtaux. L'induction de ces gènes est régulée par une série de facteurs de transcription comme SRF et Ctip2. Ces deux facteurs font l'objet d'étude au sein de notre équipe. L'altération du cytosquelette et l'interaction cellule-matrice extracellulaire conduit aussi à des phénomènes de remodelage cardiaque. Ainsi une anomalie des gènes codant pour les filaments intermédiaires comme la Desmine et la Synémine peuvent conduire à des pathologies cardiaques. D'autre part, l'altération des interactions cellule-matrice extracellulaire liée à des dysfonctionnements des intégrines pourrait aussi contribuer aux phénomènes de remodelage cardiovasculaires. L'objectif de notre étude est d'analyser les fonctions cardiaques et musculaires de Ctip2, SRF, de la Synémine et de l'intégrine alphaV à travers l'inactivation de ces gènes à un temps précis chez la souris. Nous avons appliqué à ce projet les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement. Nous avons réalisé des expériences préliminaires en cultures cellulaires qui confirment l'importance de ces gènes pour la régulation de l'activité transcriptionnelle dans les cardiomyocytes et le muscle lisse et le maintien de l'architecture cellulaire. Pour le présent projet, le choix de l'expérimentation animale se justifie par le fait qu'il n'est pas possible de reproduire en culture la fonction cardiaque, vasculaire et musculaire telle qu'elle se retrouve dans l'animal entier (organisation structurale, régulations neuro-hormonale, influence de la dépense énergétique globale de l'organisme, interaction cellule-matrice extracellulaire). L'utilisation du même matériel biologique pour 3 types d'analyse (morphologie, ARN et protéine) permet de diviser par trois le nombre de souris nécessaire. Le principe de réduction est appliqué par le calcul de puissance statistique de nos test basés sur des expériences de même type dans d'autres modèles de souris qui nous permettent de réduire à 7-10 souris par groupe d'âge, le nombre de souris utilisées. Ce projet nécessitera l'utilisation de 4 lignées de souris. 42 souris par

lignée ainsi qu'un nombre équivalent en souris contrôle seront utilisées. Ainsi 336 souris en total sont prévues pour l'ensemble du projet. L'évolution du phénotype des souris sera surveillée selon une grille de suivi qui sera mise en place. L'administration d'analgésique sera envisagée en cas de besoin. Enfin, la définition du point limite est clairement établie à partir d'un seuil d'insuffisance cardiaque observé qui déclenchera l'arrêt de l'expérience et l'euthanasie.

7473 L'insuffisance rénale (IR), est une maladie fréquente. En France, la prévalence chez les adultes est évaluée à 10%. Bien que l'on retrouve souvent les facteurs de risque CV classiques (hypertension, diabète, obésité...) chez les patients souffrant d'IR, les données démontrent que l'IR, même modérée, est un facteur prédictif de la mortalité cardiovasculaire (CV). Malgré les progrès accomplis, les mécanismes régissant les interactions cardio-rénales ne sont qu'incomplètement compris.

On sait toutefois que l'inflammation joue un rôle pivot dans le développement de l'insuffisance rénale et de ses complications CV, de plus, de récentes études suggèrent que le microbiote intestinal pourrait moduler la sévérité de ces complications.

L'aldostérone (hormone minéralocorticoïde) est connue pour réguler la balance hydro-sodée dans le rein. Son récepteur, le récepteur minéralocorticoïde (RM) est un récepteur nucléaire qui régule l'expression de gènes spécifiques.

En plus de l'épithélium rénal et intestinal, le RM est exprimé dans de nombreuses cellules non épithéliales telles que celles du cœur (cardiomyocytes), des vaisseaux (cellules endothéliales et musculaires lisses) et du rein (cellules mésangiales et podocytes). Expérimentalement, l'administration chronique d'aldostérone associée à une surcharge sodée induit une fibrose du cœur (interstitielle et périvasculaire), des vaisseaux, et du rein (glomérulosclérose et fibrose interstitielle).

Il est désormais bien établi qu'une activation inappropriée du RM s'accompagne de dommages structurels cardiaques et rénaux. Les données recueillies chez l'Homme et l'animal montrent que l'inflammation (infiltration de monocytes et macrophages, augmentation de l'expression de cytokines pro-inflammatoires) joue un rôle critique dans le remodelage induit par l'aldostérone. L'activation du RM par l'aldostérone favorise l'inflammation de plusieurs façons, notamment en stimulant la génération d'espèces réactives de l'oxygène qui activent les facteurs de transcription pro-inflammatoires. La modulation des immunités innée et adaptative par le RM dans les organes affectés par l'IR (rein, cœur, intestin...) peut également jouer un rôle critique dans l'instauration et/ou le maintien du remodelage rénal, vasculaire et cardiaque. Cet effet sur l'inflammation intestinale pourrait par ailleurs se répercuter sur la qualité du microbiote.

Les comorbidités cardiovasculaires de l'insuffisance rénale sont dramatiques et impactent la survie des patients. Il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents des interactions entre rein et cœur par exemple ou rein et microbiote, mais également d'identifier des thérapeutiques permettant de limiter ces comorbidités. Notre hypothèse est que l'inflammation induite par le RM joue un rôle central dans ces comorbidités cardiovasculaires, soit directement au niveau de l'organe cible, soit indirectement en affectant le microbiote intestinal.

L'objectif du projet est de comprendre :

1-Les effets de nouveaux antagonistes non-stéroïdiens ayant moins d'effets secondaires délétères dans l'insuffisance rénale en particulier l'hyperkaliémie.

2-les mécanismes et types cellulaires impliqués dans l'inflammation induite par l'activation du RM de manière tissu spécifique, et les effets protecteurs des antagonistes du RM sur la progression de l'insuffisance rénale chronique.

3-le rôle de l'activation du RM dans l'impact cardiovasculaire et sur le microbiote lors de l'insuffisance rénale chronique.

D'après notre expérience dans des modèles animaux proches de ce modèle d'IR et en se basant sur la littérature ainsi que sur le résultat d'un logiciel de calcul du nombre d'animaux nécessaire en (G-Power), nous aurons besoin d'un groupe de 10 souris par modèle transgénique et par condition pour limiter la dispersion biologique des paramètres étudiés (ceux que nous suivons habituellement dans notre équipe) et pour pouvoir apprécier les différences statistiques entre les résultats (un total de 1320 souris sera nécessaire pour l'ensemble du projet qui va durer 5 ans).

Face à la complexité des appareils cardiovasculaire, rénal et intestinal, aucun système accessible pour le moment in vitro ou ex vivo ne reproduit totalement le modèle intégré dont nous avons besoin.

Afin de limiter au maximum l'utilisation des souris, les souris dites "contrôles" pourront servir de contrôles pour plusieurs expériences, ainsi, environ 200 souris ne seront probablement pas utilisées si la reproductibilité des résultats nous le permet.

Nos modèles de souris intéressent d'autres équipes qui travaillent sur des sujets de recherche différents et qui pourront étudier l'impact de l'insuffisance rénale sur d'autres organes que nous n'allons pas étudier comme le foie et la peau.

Les mesures de raffinement inclus une anesthésie générale ainsi qu'une analgésie pré et post-opératoire lors de l'induction de l'IR chez les animaux, les protocoles thérapeutiques que nous allons utiliser sont maîtrisé et utilisé régulièrement dans notre équipe.

Les points limites ainsi que les critères d'interruption d'expérimentation sont prédéfinis et un suivi rigoureux des animaux est mis en œuvre afin d'assurer le bien-être des animaux du début à la fin de l'étude.

7474 La toxoplasmose est une infection parasitaire causée par un protozoaire intracellulaire, *Toxoplasma gondii*. Dans la majorité des cas d'infection humaine, la toxoplasmose est une maladie asymptomatique. En effet, le système immunitaire permet un ralentissement de la vitesse de multiplication du parasite qui va former des kystes tissulaires dans différents types de tissus, tels que le cerveau ou le cœur. Cependant, chez les immunodéprimés, une réactivation du parasite peut être observée, menant à des formes plus graves : l'encéphalite et la rétinocoroïdite, due à des lésions au niveau de la rétine. De plus, chez la femme enceinte séronégative, une infection à *T. gondii* peut provoquer des malformations du fœtus au niveau de l'œil et du cerveau, voir un avortement. L'Homme n'est pourtant qu'un des hôtes intermédiaires (HI) de *T. gondii*. L'infection humaine se fait principalement par voie orale, soit par ingestion d'oocystes extrêmement résistants, rejetés par les chats et autres félidés (hôtes définitifs, HD) dans l'environnement, souillant fruits, légumes ou eau de boisson ; soit par consommation de viande mal cuite contenant des kystes tissulaires présents dans les viandes d'animaux de bétail ou de gibier (hôtes intermédiaires, HI). Les félidés, et les chats en particulier, sont donc au cœur des problèmes de contamination de l'environnement et du bétail par *T. gondii*. Suivant le concept « one health – une santé », développer un vaccin ciblant les chats afin de prévenir les contaminations environnementales par *T. gondii* pour protéger la santé publique, est essentiel. La mise au point de vaccins efficaces contre la toxoplasmose a été largement freiné par le manque de données disponibles sur le cycle de reproduction sexuée du parasite qui a lieu uniquement chez les félins. Ceci est notamment dû aux difficultés rencontrées avec le modèle chat (raisons éthiques, financières, peu d'anticorps disponibles, de lignées cellulaires...). Le projet proposé offre une nouvelle approche pour rompre le cycle sexué du parasite par le développement de stratégies de vaccinations innovantes et efficaces ciblant l'HD (chat), afin de lutter contre *T. gondii* et prévenir la toxoplasmose humaine et animale.

Afin de pouvoir étudier d'étudier l'immunogénicité et la protection d'un nouveau candidat vaccin, il est indispensable de travailler sur des organismes entiers vivants immunocompétents. Un précédent projet ayant fait l'objet d'une évaluation éthique favorable a permis d'apporter de nombreuses informations quant à la réponse immunitaire des chats vis-à-vis de la souche vaccinale et du parasite sauvage. Pour être au plus près des conditions d'administration futures du vaccin, nous avons désormais besoin de déterminer si cette réponse immunitaire est équivalente lorsqu'on donne au chat la souche vaccinale sous forme orale, et si la protection des animaux vaccinés contre l'infection par *T. gondii* est efficace. Pour cela, sur les 5 ans du projet, 39 chats au maximum seront inclus dans les essais vaccinaux (3 essais de vaccinations sur 5 ans avec 13 animaux par essai). Si le vaccin administré par voie orale induit une production d'oocystes (soit après vaccination soit après le test d'épreuve avec le parasite sauvage), la virulence de ces oocystes sera testée chez la souris. (144 souris maximum au total sur 5 ans). A l'issue des expérimentations les animaux seront euthanasiés. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des « 3R » (ensemble de recommandations concernant les moyens à mettre en œuvre pour limiter l'utilisation des animaux : Remplacer, Réduire et Raffiner), en particulier, le nombre d'animaux utilisés sera le plus faible possible tout en permettant l'obtention de résultats interprétables : si aucun oocyste n'est excrété par

les chats, aucune souris ne sera utilisée. De même, si certains chats excrètent des oocystes et d'autres non, le nombre de souris utilisées sera diminué en conséquence. Les infestations par les parasites étudiés sont asymptomatiques dans les espèces utilisées, de ce fait l'impact de ces manipulations sur les animaux est limité à la réalisation de prises de sang.

7475 Le maintien de la masse musculaire résulte d'un équilibre entre synthèse et dégradation protéique. Ces deux processus sont finement régulés par différents facteurs nutritionnels (acides aminés, hormones, micronutriments...) et peuvent être influencés par le statut physiopathologique de l'individu. Ainsi, le vieillissement et l'obésité, deux problèmes de santé publique majeurs dans les pays économiquement développés, sont caractérisés par une fonte musculaire conduisant à un risque accru de chute et de fracture et à une augmentation du risque de dépendance et de perte de la qualité de vie. Cette fonte de la masse musculaire résulte d'une diminution de la synthèse protéique musculaire en lien avec une altération des fonctions mitochondriales et une accumulation des substrats énergétiques lipidiques au sein de la cellule musculaire. La protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) joue un rôle majeur dans le maintien de la balance énergétique de l'organisme. En effet, en intégrant les signaux hormonaux et nutritionnels, l'AMPK coordonne l'apport, l'utilisation et le stockage de l'énergie. L'AMPK est activée par différents stress induisant une déplétion de la cellule en énergie. Une fois activée, l'AMPK modifie l'activité et l'expression de différentes protéines cibles en activant les voies métaboliques productrices d'énergie et en inhibant les voies consommatrices.

Dans le muscle squelettique, l'AMPK régule de nombreuses voies métaboliques comme le transport de glucose, la dégradation des acides gras et la synthèse protéique. Dans un contexte d'obésité et/ou de vieillissement, l'activité de l'AMPK est dérégulée dans le muscle squelettique. L'objectif de ce programme de recherche est d'évaluer le rôle de l'AMPK dans le développement de la fonte musculaire (liée à la perte protéique musculaire) avec l'âge et/ou l'obésité. Pour cela, un modèle de souris transgénique n'exprimant pas les sous-unités catalytiques de l'AMPK, exclusivement au niveau musculaire sera utilisé (souris AMPK-KO).

Pour l'étude sur l'obésité, 40 souris mâles sauvages de 3 mois et 40 souris mâles AMPK-KO de 3 mois seront nourries avec un régime standard ou un régime hypercalorique et hyperlipidique pendant 16 semaines. Les animaux seront euthanasiés en conditions post-prandiales ou à jeun.

Pour l'étude sur le vieillissement, des souris mâles adultes sauvages et AMPK-KO seront utilisées à 6 ou 24 mois. A chaque âge, 20 animaux par groupes seront abattus : 10 animaux à jeun et 10 animaux en période postprandiale. Des études antérieures ont montré que la mortalité est d'environ 50% pour atteindre l'âge de 24 mois, aussi prévoyons nous de doubler le nombre de souris pour obtenir l'effectif nécessaire au bout de 24 mois. Le nombre total de souris sera donc de 60 souris WT et 60 AMPK-KO, soit 120 souris.

Pour les deux études, différents paramètres seront étudiés : des paramètres métaboliques (synthèse protéique musculaire, métabolisme mitochondrial...) et des paramètres fonctionnels (force musculaire, mobilité...).

En conformité avec la règle des 3R, le nombre d'animaux est limité à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs soit 200 animaux au total pour les deux études.

L'ensemble du projet comporte 9 procédures les degrés de gravité sont de classe légère (7), modérée (1) et sans réveil.

Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire et remplacer). Ainsi le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum et limité à 10 tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu. Les paramètres fonctionnels mesurés dans ce projet (force musculaire, mobilité...) ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire.

7476 Notre travail se base sur l'hypothèse que les tumeurs évoluent et progressent de manière incontrôlée lorsque les réponses immunitaires anti-cancéreuses échouent. Il a été démontré qu'une immunosurveillance naturelle influence clairement la progression du cancer humain parce que le

pronostic des patients est dicté par la densité, la composition et l'activité de l'infiltré immunitaire de la tumeur au moment du diagnostic.

De même, il a été prouvé que l'efficacité des agents anticancéreux classiques et ciblés n'est pas seulement due à des effets cytostatiques/cytotoxiques directs, mais repose également sur la (ré) activation des réponses immunitaires antitumorales. La chimiothérapie peut favoriser ces réponses en augmentant l'immunogénicité des cellules malignes, ou en inhibant les circuits immunosuppresseurs qui sont établis par le développement de néoplasmes.

Récemment il a été prouvé que la bactérie intracellulaire *Chlamydia trachomatis* peut moduler l'immunogénicité de la cellule hôte.

Compte tenu de ces arguments, l'objectif principal de ce projet est de déterminer un éventuel effet immunogène de *Chlamydia trachomatis* par des études de vaccination anti-tumoral chez la souris. Les procédures expérimentales mises en jeu dans ce projet respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Cette étude nécessite l'implication d'animaux vivants car un organisme vivant entièrement fonctionnel est indispensable du fait de l'étude de l'impact de l'immunité dans ces processus. Il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *ex-vivo* du fait de sa complexité. Par ailleurs, le modèle de carcinogénèse étudié a été développé chez la souris pour permettre ce type d'étude. Nous projetons d'utiliser, dans les prochaines 3 années, des souris immunocompétentes (maximum 648). Les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. Plusieurs tissus seront prélevés et soumis à diverses analyses (immunologiques, histologiques ou de biologie cellulaire et moléculaire) pour extraire le maximum de données de chaque expérimentation. Ces tissus seront également partagés avec nos collaborateurs dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés. 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). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Si les souris sont faibles, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis, ainsi que des moyens supplémentaires pour maintenir la température corporelle. 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.

7477 L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neurodégénératives et cancers. La restriction calorique est un inducteur majeur de l'AP. Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées à l'apport bénéfique de la restriction calorique dans le traitement des cancers. Récemment, il a été démontré qu'une courte période de jeûne protège les cellules normales de l'effet cytotoxique de composés utilisés pour la chimiothérapie des cancers. Dans le même temps, la sensibilité des cellules cancéreuses à la mort cellulaire induite par ces composés chimiothérapeutiques était augmentée. La transposition du jeûne à la chimiothérapie du cancer reste difficile à appliquer dans un contexte clinique; certains patients pourraient ne pas tolérer un jeûne prolongé. Une stratégie consiste à substituer le jeûne par l'administration de composés capables de mimer la restriction calorique (CRMs, caloric restriction mimetics). Ce mimétisme se traduit au niveau cellulaire par une réduction de l'acétylation des protéines cytosoliques associée à l'induction de l'autophagie. Nous avons identifié, *in vitro*, des CRMs inédites. Nous avons besoin de réaliser des expériences *in vivo* chez les souris afin de pouvoir confirmer nos données obtenues *in vitro*. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences d'induction de l'autophagie chez la souris en présence et/ou absence de différents régimes alimentaires (normal, gras et en présence de sucre) et de stress aigue et/ou chronique. Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas

de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique. Ce projet, d'une durée maximale de 5 ans, impliquera l'utilisation de souris immunocompétentes (n=678) et transgéniques (n=1746). Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de souris si la significativité apparaît avec moins de souris. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons et bâtonnets à ronger).

7478 La fibrose pulmonaire idiopathique est une maladie fréquente et grave où le poumon est progressivement remplacé par une cicatrice rigide n'assurant pas les échanges gazeux.

Une famille de cellules appelées « cellules mésenchymateuses » joue un rôle de premier plan dans le développement de la fibrose. Nos travaux préalables réalisés *in vitro* et à partir de prélèvements humains suggèrent qu'une protéine appelée Runt-related transcription factor 1 (RUNX1) joue un rôle très important dans l'activation des cellules mésenchymateuses et dans le développement de la fibrose pulmonaire idiopathique.

L'objectif principal de ce projet est de faire la preuve que la répression de RUNX1 protège du développement de la fibrose pulmonaire induite par une administration dans le poumon d'un médicament anticancéreux, la bléomycine, chez la souris (mâle).

L'expression de RUNX1 dans le poumon sera réprimée par un produit de synthèse appelé « ARN interférent », administré par voie pulmonaire.

Nous projetons également de démontrer que l'effet protecteur de l'inhibition de RUNX1 est lié à la diminution de son activité d'expression du génome.

Ces résultats feront la preuve de concept d'une nouvelle famille de traitements, applicables à la fibrose pulmonaire idiopathique mais aussi à de nombreuses autres maladies fibrosantes atteignant d'autres organes.

Le nombre total de souris nécessaires pour mener à bien ce projet est de 210.

Les expérimentations ont été planifiées selon la règle des « 3R ». Remplacer : les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser la complexité d'un organisme entier, par conséquent des modèles animaux sont nécessaires pour faire la preuve de l'intérêt d'une approche thérapeutique. Le modèle de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine est établi et permet de reproduire le phénomène observé chez l'homme. Réduire : les expériences ont été planifiées dans un ordre précis pour réduire le nombre d'animaux. Le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats robustes a été calculé en fonction des tests statistiques utilisés et de la survie attendue des animaux. Raffiner : les administrations seront réalisées sous anesthésie. Les animaux seront élevés en communauté dans des cages enrichies avec du papier absorbant et des fragments de boîtes à œufs, et surveillés quotidiennement.

7479 Avec près de 7 millions de décès par an, le cancer (tous types confondus) représente en ce début de 21ème siècle environ 12% des décès humains au niveau mondial, valeur qui n'est dépassée que par celles des maladies cardio-vasculaires (30%) et des maladies infectieuses (19%) comme cause de mortalité. Du fait du vieillissement de la population et de l'incidence réduite des maladies infectieuses, le cancer est la cible de nombreuses attentions de la part des acteurs de santé publique des pays développés. Cela ne doit pas faire oublier que plus de 70% des décès incombant au cancer sont de fait enregistrés dans des pays pauvres ou en voie de développement, dans lesquels on observe graduellement un contrôle accru des maladies transmissibles ainsi qu'une augmentation significative de l'âge moyen de la population. A cet égard, des études indiquent que le nombre de décès imputables au cancer a augmenté d'environ 30% dans les pays développés sur la période 1990-2010,

contre plus du double (71%) dans les pays en voie de développement, par le seul effet de ces changements démographiques.

En dépit des progrès thérapeutiques réalisés, la mortalité induite par ces pathologies reste élevée. L'identification de nouvelles cibles tumorales et de nouveaux modes d'action thérapeutique pour le contrôle et/ou l'éradication des tumeurs chez les patients reste donc une priorité. Cet objectif est sérieusement contrarié par l'absence de modèles animaux pleinement représentatifs de la maladie humaine. Ce besoin est d'autant plus criant pour le test préclinique de nouvelles molécules anti-tumorales qui nécessitent la présence de cellules immunitaires humaines pour valider leur mode d'action, et pour lesquelles toute évaluation dans un modèle animal classique est peu informative.

Pour répondre à cette limitation, nous souhaitons générer de nouveaux modèles expérimentaux des cancers humains, dans un système faisant intervenir des cellules immunitaires humaines (souris humanisées). Nous avons déjà pu établir, pour d'autres projets, la pertinence du recours à la génération de souris humanisées pour le système immunitaire (HSI), dont la génération repose sur la xéno-transplantation de cellules hématopoïétiques humaines chez des animaux particulièrement prédisposés à la prise de xénogreffe.

En proposant comme modèle la souris humanisée pour le système immunitaire, nous faisons le choix d'utiliser un modèle expérimental préclinique permettant le criblage d'approches thérapeutiques anti-tumorales directement adaptées à la situation humaine.

Dans le cadre de la présente demande d'autorisation de projet utilisant des souris de laboratoire et s'inscrivant dans la démarche 3R ('Réduction, Raffinement, Remplacement), nous développerons pour différents types de tumeurs humaines de nouveaux modèles de souris doublement humanisées ('raffinement' : HSI et tumeurs), avec une double perspective : (i) identifier et caractériser expérimentalement les interactions entre le système immunitaire humain et des tumeurs humaines ; et (ii) établir une plate-forme préclinique attrayante et pertinente pour le développement et le criblage de nouvelles approches thérapeutiques, entre autres pour éviter le recours aux primates non-humains (pertinence ; considérations éthiques de 'remplacement' ; coût). Ces nouveaux modèles seront validés avec des molécules anti-tumorales connues, puis ils seront confrontés à de nouveaux traitements expérimentaux contre différents types de tumeurs humaines.

Il est prévu d'utiliser 300 souris par an pour ce projet (total de 1500 animaux sur 5 ans). Pour les deux procédures, outre la valence 'réduction' qui est optimisée après plus de 10 ans de développements technologiques, tout sera mis en œuvre pour que ne soit pas atteint le degré de gravité « sévère ». Du fait de leur degré d'immunodéficiência, les animaux seront hébergés dans des conditions qui permettent le maintien de souris exemptes d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS). Le suivi des animaux sera adapté aux caractéristiques des tumeurs individuelles. L'évolution des tumeurs sera contrôlée au minimum 2 fois par semaine et jusqu'à une fois par jour en fin de cinétique tumorale. Le point limite en terme de volume tumoral sous-cutané suit le référentiel adopté par notre CEEA, qui recommande de ne pas dépasser un diamètre de 12mm (~900mm³) à 15mm (~1800mm³) dans le cadre d'un essai thérapeutique. Un relevé méthodique des signes d'inconfort (posture indicatrice de souffrance ; texture de poil non soignée ; activité réduite ; perte de poids) sera également assuré. En cas de dégradation sévère des animaux (prostration ; posture et apparence très affectées ; perte de poids $\geq 20\%$; volume tumoral sous-cutané important), une euthanasie sera mise en œuvre.

7480 La croissance de la population mondiale nécessitera une évolution rapide de l'élevage pour satisfaire la demande croissante en protéines animales. Pour assurer cette croissance, il faudra cependant « produire plus avec plus de protéines non valorisables par l'homme, moins de surfaces arables et moins d'impacts environnementaux ». L'élevage laitier est particulièrement concerné car la demande en produits laitiers augmente rapidement dans les pays en développement et il mobilise beaucoup de ressources entrant en compétition avec l'homme.

L'efficacité alimentaire traduit la capacité d'un animal à bien valoriser l'aliment ingéré. L'amélioration de l'efficacité alimentaire des vaches laitières contribuerait à mieux valoriser l'aliment ingéré et réduirait à la fois les besoins en aliments des élevages laitiers, mais aussi les émissions de gaz à effet de serre et les rejets azotés. Cependant, suivant les mécanismes physiologiques mis en jeu pour accroître l'efficacité, la reproduction, la santé et la longévité des vaches peuvent être plus ou moins dégradées. Ce projet vise à construire des stratégies d'améliorations de l'efficacité alimentaire qui

pourraient être diffusables rapidement à grande échelle par la sélection génétique tout en préservant ou renforçant la robustesse et le bien-être des animaux.

L'étude de la variabilité de l'efficacité alimentaire nécessite de d'étudier un nombre significatif d'individus avec un nombre important de caractères étudiés simultanément. Les vaches laitières ayant une carrière productive longue, les essais doivent s'étendre sur une longue période, idéalement plusieurs lactations successives ce qui permettra également d'aborder la question des réserves minérales.

Au total, les 4 ans du projet mobilisera 190 vaches conduites dans des conditions d'élevage proches des conditions d'élevages commerciaux mais en réalisant un grand nombre de mesures.

Pour répondre à ces besoins expérimentaux, la règle des 3R sera suivie. Remplacement : il n'est pas possible de remplacer les animaux pour étudier la variabilité individuelle de ce caractère des vaches laitières. Réduction : Dans ce travail, et compte tenu des travaux déjà publiés, les effectifs utilisés sont adéquats pour étudier les déterminants de cette variabilité et pour définir les caractères intéressants pour une étude de la variabilité génétique de l'efficacité qui nécessite des effectifs plus importants. Raffinement : Des efforts importants ont été portés pour réduire le nombre d'inventions auprès des animaux nécessaires pour l'étude des déterminants de l'efficacité. Les nouvelles méthodes de phénotypage non invasives et commercialisées seront privilégiées telles que des colliers mesurant l'activité physique ou la durée d'ingestion et des thermobolus permettant de suivre la température corporelle et l'abreuvement. Certains phénotypes ne disposent cependant pas d'outils ou de méthode de mesures à haut-débit nécessaires pour ce projet. L'état corporel bénéficiera du développement d'une méthode de mesure par imagerie qui rend le phénotypage accessible à haut débit et avec précision. De même, pour réduire l'impact du phénotypage de la digestibilité sur l'animal, le projet vise au préalable à développer une nouvelle méthode de mesure en conditions d'élevage.

7481 Chacune de nos cellules contient l'ensemble de notre patrimoine génétique : 46 chromosomes hérités de nos parents sur lesquels on compte environ 25 000 gènes. Mais si toutes nos cellules contiennent la même information, elles n'en font visiblement pas toutes le même usage : une cellule de la peau ne ressemble en rien à un neurone, une cellule du foie n'a pas les mêmes fonctions qu'une cellule du cœur. De même, deux jumeaux qui partagent le même génome ne sont jamais parfaitement identiques. Dans ces exemples et dans bien d'autres, la clé du mystère se nomme "épigénétique".

La génétique correspond à l'étude des gènes, l'épigénétique s'intéresse à une « couche » d'informations complémentaires qui définit comment ces gènes vont être utilisés par une cellule ou ne pas l'être. Concrètement, ces modifications épigénétiques sont matérialisées par des marques biochimiques, apposées par des enzymes spécialisées sur l'ADN ou sur des protéines qui le structurent, les histones. Les marques les mieux caractérisées sont les groupements méthyle (CH₃ : un atome de carbone et trois d'hydrogène) apposés sur l'ADN, ainsi que diverses modifications chimiques des histones (méthylation, acétylation...). Dans notre étude, nous avons choisi de nous intéresser spécifiquement à la méthylation de l'ADN.

Notre but est d'étudier la variabilité du taux global de méthylation de l'ADN. Notre étude consiste à caractériser ce taux global de méthylation de l'ADN dans les cellules du sang et la corrélation avec d'autres tissus, son degré de variabilité entre animaux au sein d'une même race et entre différentes races, ainsi que pour le même animal au cours de sa croissance.

Pour réaliser cette étude, nous allons étudier 3 races différentes de bovins (Romane, BlackBelly et Charollaise), toutes présentes sur une même unité expérimentale, afin de réaliser les prélèvements au même moment et dans un environnement similaire. Vingt animaux par race, soit 60 en tout, seront étudiés par des prélèvements sanguins sériés tous les mois de la naissance à 5 mois. Ce qui représente 6 prélèvements par animal. Après le cinquième mois, environ 30 animaux (ayant des taux de méthylation global extrêmes) seront abattus et de nombreux tissus seront collectés par animal. Les mesures de méthylation de l'ADN pris à différents moments dans le sang et dans différents tissus nous permettront de mieux caractériser les variations qui existent dans cette information épigénétique.

La règle des 3R sera respectée comme suit :

- Remplacement : Les mesures de taux de méthylation sanguin et leurs évolutions dans le temps ne peuvent être réalisées qu'avec l'utilisation d'animaux vivants. Aucune alternative n'existe.

- Réduction : Chez les animaux, la variabilité du taux global de méthylation de l'ADN reste inconnue. L'effectif de 20 animaux par race nous permettra de caractériser ce nouveau caractère et d'évaluer sa variabilité intra-race et inter-races.

- Raffinement : Les prises de sang seront réalisées par le personnel de l'EU possédant les compétences adaptées et réalisant ce type de prélèvement fréquemment. Cet essai en conditions d'élevage n'entraînera pas de souffrance ni de stress en dehors des prises de sang. Si un animal est malade il sera soigné et retiré de l'étude si nécessaire (selon l'avis de la vétérinaire de la structure bien-être animal et des porteurs du projet). Le milieu sera enrichi par un disque à mordiller suspendu.

7482 Chez la vache laitière, les bactéries à Gram négatif, et en particulier *Escherichia coli* sont les principaux germes responsables des infections de la glande mammaire (ou mammites) qui s'expriment cliniquement, parfois de façon sévère. La fréquence de ces mammites ne diminue pas en raison de pratiques d'élevage et d'une prédisposition génétique accrue à ces infections des vaches laitières hautes productrices. Cette maladie provoque de lourdes pertes financières et impacte fortement le bien-être des bovins laitiers. Les méthodes de prévention et de traitement actuellement disponibles ne permettent qu'une légère diminution de la fréquence et de la sévérité des infections cliniques. Une meilleure connaissance des mécanismes permettant aux colibacilles de provoquer une infection mammaire est attendue comme un facteur d'amélioration de la santé et du bien-être des vaches laitières et de la qualité du lait.

L'objectif du projet est de comparer le pouvoir infectieux pour la mamelle d'une souche de *E. coli* et de quatre mutants dont certains gènes, impliqués dans l'acquisition du fer par les colibacilles, ont été inactivés. La souche parentale est connue pour induire des mammites de sévérité modérée. Les mutants devraient induire des mammites d'intensité inférieure, ou être incapables d'induire une infection. Les résultats obtenus pourront être utilisés pour développer une nouvelle approche pour prévenir les mammites colibacillaires.

Pour atteindre cet objectif, cinq lots de vaches seront infectés en début de lactation dans un seul quartier avec une des souches de *E. coli* à évaluer. L'expérimentation sera conduite en deux vagues en raison des capacités maximales des locaux d'expérimentation en niveau de confinement 3, imposée par l'utilisation de bactéries génétiquement modifiées. Compte tenu des résultats attendus et de la diversité connue de réponse des vaches à l'infection colibacillaire, un nombre de 6 vaches par lot est nécessaire pour établir une hiérarchie de pouvoir infectieux entre les mutants et la souche parentale. In fine il est prévu d'infecter 30 vaches.

La règle des 3 R a été respectée comme suit :

Réduction : les effectifs des groupes (6 animaux) sont nécessaires et suffisants pour mettre en évidence une différence liée à la mutation. Le nombre de mutants testés est réduit au minimum possible en fonction des hypothèses émises sur la possible influence des mutations sur le cours de l'infection.

Remplacement : il n'est pas possible de remplacer les vaches par des animaux de laboratoire en raison de la composition particulière du lait de vache en élément en rapport avec le système d'acquisition du fer évalué dans l'expérimentation. Les mesures *in vitro* ne sont pas non plus modélisables en raison de la composition constamment changeante du lait au cours de la réaction inflammatoire induite par l'infection.

Raffinement : les animaux seront hébergés dans un milieu enrichi de brosses pour le confort des animaux. Les températures corporelles seront enregistrées en continu grâce à des bolus ruminiaux, ce qui limitera la manipulation des animaux.

7483 Le dérivé de platine cis-diamminedichloroplatinum (II), connu sous le nom de cisplatine, est utilisé pour le traitement de patients atteints de cancers pulmonaires, de la vessie, de la tête et du cou, ovariens et testiculaires. A l'exception des cancers testiculaires, pour la plupart des autres types de cancers, le bénéfice thérapeutique est rapidement limité par le développement d'une résistance des cellules cancéreuses à cet agent, en dépit de réponses initiales prometteuses. Des données récentes suggèrent que l'oncogenèse et la progression tumorale sont intimement associées au remaniement du métabolisme cellulaire. Par ailleurs, des altérations du métabolisme cellulaire associées à la

résistance au cisplatine ont été identifiées dans des cancers de différentes origines tissulaires et nous avons pu montrer *in vitro* que ces altérations s'accompagnaient d'une sensibilité accrue à la privation nutritionnelle. De façon intéressante, la restriction calorique potentialise la mort des cellules cancéreuses induite *in vitro* par des agents chimio-thérapeutiques. Le but de ce projet est de vérifier l'effet anti-tumoral de la privation nutritionnelle seule ou associée à des agents chimio-thérapeutiques ciblant le métabolisme tumoral chez l'animal afin d'envisager une nouvelle approche thérapeutique chez l'homme.

Nous ne pouvons effectuer cette étude que *in vivo* car il n'y a pas de d'autre technique qui permette de suivre la croissance d'une tumeur dans son contexte pathophysiologique. Pour cela, nous effectuerons des expériences de greffes de cancers pulmonaires humains ou murins, résistants ou sensibles au cisplatine, chez des souris qui seront soumises à des manipulations expérimentales bien tolérées et nous évaluerons la croissance tumorale et la survie de l'animal. Les traitements seront groupés de façon à limiter le nombre de souris (un maximum de 600 souris est estimé pour un projet qui se déroulera sur 3 ans). Nous avons sélectionné les traitements qui se sont révélés les plus efficaces *in vitro* et qui sont connus pour leur bonne tolérance chez la souris selon la littérature. Les bénéfices escomptés sont une réduction de la croissance tumorale et une augmentation de la survie des souris significatives. 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. Si les souris atteignent les points limites, l'expérimentation sera arrêtée. Aucune médication supplémentaire ne sera administrée au cours des expériences. De plus, le personnel impliqué dans ce projet est qualifié sur le plan technique et formé en continu sur les pratiques d'expérimentation animale. Il assure également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. Nous pensons que la réalisation de ce projet fournira des connaissances sur les caractéristiques métaboliques des cancers résistants au cisplatine pour la mise en place de stratégies thérapeutiques ciblées chez les patients.

7484 Le disque intervertébral (DIV) est un composant fondamental de la colonne vertébrale et il joue un rôle essentiel dans la mobilité du rachis. Les DIV sont constitués de deux structures : le Nucleus pulposus ou noyaux pulpeux (NP) au centre et une partie périphérique, l'Annulus fibrosus ou anneau fibreux (AF). Sa fonction principale est le résultat d'une action coopérative entre le NP et l'AF, lui permettant d'absorber les chocs ainsi que de jouer un rôle majeur dans la flexibilité de la colonne vertébrale.

La lombalgie est un problème de santé majeur, ayant des conséquences socio-professionnelles et économiques considérables. Il est estimé qu'environ 80% de la population mondiale souffrira de lombalgie à un moment donné au cours de la vie. Entre 8 et 20% des lombalgies chroniques sont associées à une hernie discale, définie comme une protrusion d'une partie du NP à travers l'AF dans le canal rachidien pouvant induire la compression d'un nerf. L'origine de la hernie discale est peu connue, mais celle-ci est souvent associée à des facteurs de risques environnementaux (répétition des contraintes, traumatismes mécaniques...). Les traitements chirurgicaux des hernies discales consistent à enlever le tissu hernié. Cependant, il a été démontré que l'efficacité de ces micro-discectomies est symptomatique et de courte durée, avec un risque de réapparition de la hernie d'environ 10 à 20%. En effet, les hernies discales et les discectomies induisent une diminution de la hauteur discale et ne réparent pas les dommages au niveau de l'AF. Ceci modifie considérablement les propriétés mécaniques du DIV et peut contribuer au processus de dégénérescence des DIV.

De nombreuses études ont développé des stratégies d'ingénierie tissulaire axées exclusivement sur la restauration du volume discal par réparation de la partie centrale du DIV, le NP, au détriment du rétablissement de l'intégrité structurale de l'AF. Or, des défauts non réparés au sein de l'AF augmentent le risque d'échec de ces thérapies par réapparition d'une hernie discale au niveau du DIV réparé, dans 10 à 18% des cas. Certaines stratégies, actuellement utilisées en clinique, consistent à obstruer les lésions au niveau de l'AF par implantation d'un dispositif de comblement ou à suturer celles-ci à l'aide de fils de suture et colle. Cependant ces techniques ne rétablissent pas les propriétés mécaniques de l'AF et ne permettent pas d'induire un processus de régénération de celui-ci. Ainsi,

face aux nombreuses limites des thérapies existantes, l'ingénierie tissulaire offre aujourd'hui de nouvelles perspectives de traitements des lésions de l'AF qui permettraient de prévenir les risques de réapparition de hernies discales, restaurer les propriétés biomécaniques du disque et augmenter l'efficacité des stratégies de réparation du NP.

Dans ce contexte, notre projet propose de développer des biomatériaux implantables pour la réparation de lésions d'AF. La structure de ces implants reproduira l'organisation fibreuse caractéristique de la matrice extracellulaire de l'AF sain, grâce à des techniques basées sur l'« electrospinning », autrement appelé électrofilage. Ce projet offrira les résultats préalables indispensables avant d'envisager les premiers essais cliniques chez l'homme.

L'utilisation de ces biomatériaux a été testée *in vitro* avec des cellules de l'Annulus fibrosus (humaine et ovine) et a démontré l'attachement et la prolifération de ces cellules ainsi que la synthèse de matrice extracellulaire à la surface de ces matériaux. Il apparaît maintenant important d'évaluer *in vivo* la faisabilité et la preuve de concept de la réparation d'un défaut de l'AF par ces biomatériaux. Afin de réaliser ces expérimentations, 12 brebis seront nécessaires.

Ce projet est conçu dans le respect de la règle des 3 R :

Remplacement : la capacité de régénération de lésions d'AF par ces biomatériaux ne peut être démontrée que par évaluation *in vivo*. Le modèle ovin est choisi en raison de la grande proximité anatomique et biomécanique entre le rachis de l'Homme et celui de la brebis, autorisant l'utilisation des mêmes matériels pour la voie d'abord chirurgicale.

Réduction : le nombre d'animaux prévu dans ce projet est réduit au minimum avec un objectif fixé afin d'obtenir des résultats significatifs permettant de conclure sur la pertinence de notre approche. Pour ce faire, un suivi *in vivo* par imagerie (radiographie et IRM) est réalisé afin de limiter au maximum le nombre d'animaux euthanasiés tout en obtenant des résultats pertinents sur l'état du disque intervertébral lombaire.

Raffinement : les animaux seront hébergés dans des conditions adaptées à l'espèce avec un enrichissement du milieu. Tous les animaux auront libre accès à l'eau et à la nourriture durant toute la durée des expériences. Les animaux seront surveillés tous les jours par les animaliers prévenant rapidement le chercheur et le vétérinaire d'une quelconque anomalie. Une grille comportementale a été mise en place afin d'évaluer la douleur chez l'animal et les critères limites justifiant un arrêt prématuré du protocole et l'euthanasie des animaux. Par ailleurs, l'ensemble des procédures (chirurgie et imagerie) se déroule sous anesthésie générale afin de d'éviter tout stress et toute souffrance.

7485 Le médulloblastome est la plus fréquente des tumeurs malignes du système nerveux central chez l'enfant. Les traitements actuels restent très agressifs pour lutter contre les métastases et les risques de récurrence. Ces traitements sont à l'origine dans tous les cas de séquelles définitives (cognitives ou physiques). Il est donc essentiel de trouver des traitements plus sélectifs et moins agressifs vis à vis des tissus sains afin d'améliorer la qualité de vie de ces jeunes patients. Récemment, il a été montré que la voie de signalisation impliquant le récepteur neuropiline-1 (NRP-1) semble être une voie importante impliquée dans la progression du médulloblastome. Nos résultats *in vitro* avec un nouveau composé, antagoniste de NRP-1, montre un réel intérêt sur le devenir des cellules de médulloblastome en association ou non avec la radiothérapie. Malheureusement, le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le développement tumoral et dans la réponse aux agents thérapeutiques et par conséquent à l'heure actuelle nous ne pouvons remplacer les modèles *in vivo* par des approches alternatives (Remplacement). Nous proposons donc dans la suite de ce projet d'évaluer *in vivo* l'intérêt d'inhiber NRP-1 avec ce composé pour limiter la progression du médulloblastome notamment en association avec la radiothérapie. Ce projet débutera par une première étude de tolérance du composé à des concentrations de 1 et 10 mg/kg (concentration équivalente à la concentration testée *in vitro* ou 10 fois supérieure) pour écarter les éventuelles effets indésirables du composé sur 10 souris Nude femelles qui seront suivies pendant 14 jours après administration (Réduction). Nous évaluerons ensuite l'efficacité anti-tumorale du composé sur 3 modèles de médulloblastomes xénogreffés en sous cutanée chez la souris Nude de façon séquentielle en commençant par le modèle de médulloblastome ayant montré la meilleure sensibilité *in vitro* vis à vis du composé. Ces modèles présentent des caractéristiques différentes en terme de

réponses aux thérapies conventionnelles mais ont montré tous les 3 une sensibilité à notre composé. Cependant si la réponse n'est pas satisfaisante sur la croissance ou l'invasion tumorale sur le modèle qui semble le plus sensible, la suite des expérimentations sera abandonnée (réduction). Pour cette étude d'efficacité tumorale, nous utiliserons au total 120 souris, les animaux seront euthanasiés au plus tard 40 j après le début des traitements. Par conséquent, le projet utilisera au total 130 animaux pour l'étude de tolérance et l'étude d'efficacité anti-tumorale. Finalement, le choix de points limites relativement précoces par rapport à l'évolution de la pathologie en tenant compte notamment du volume ou de l'aspect des tumeurs, ainsi que de la présence de masses tumorales distantes du site d'injection (métastases) permettra un arrêt éthiquement et scientifiquement acceptable des expérimentations (Raffinement).

7486 La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a permis le développement de matériaux injectables (matrices) pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ces matrices injectables doivent pouvoir durcir une fois implantées chez le patient et présenter des propriétés mécaniques comparables à celle du cartilage. Notre domaine de recherche est la régénération des tissus squelettiques tels que le cartilage. Le cartilage articulaire est sujet à de nombreuses lésions d'origine traumatique, métabolique ou liées au vieillissement. Ces atteintes affectent une part significative de la population humaine, canine et équine et résultent en une dégradation de la qualité de vie des patients et entraînent contre-performance, invalidité, indisponibilité ou réforme pour les filières équine et canine. Ce tissu est dépourvu de capacités de réparation intrinsèques et nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Des techniques de réparation chirurgicales (microfracture, mosaïcoplastie, greffe de chondrocytes) ont été cliniquement utilisées. Cependant, aucune de ces techniques n'a démontré de succès cliniques significatifs et durables.

Dans ce projet, nous proposons le développement et l'évaluation d'un hydrogel associé à des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour réparer des défauts focaux du cartilage chez le cheval, une thérapie potentiellement transférable à l'homme.

Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une source prometteuse de cellules capables de se différencier en chondrocytes (cellules cartilagineuses). Il paraît important d'étudier *in vivo* la capacité chondrogénique de l'association des CSM induites *in vitro* et de l'hydrogel.

Le Projet présenté ici sera réalisé sur le modèle cheval, au total 6 animaux seront utilisés.

Conformité avec les exigences 3R : Remplacement, Réduction et Raffinement :

De précédentes études ont montré que l'hydrogel permettait la prolifération de chondrocytes.

Remplacement. La biocompatibilité de cet hydrogel a été testée *in vitro*. Néanmoins, la capacité chondrogénique de l'association CSM-hydrogel ne peut être démontrée que par une évaluation *in vivo*. Cette approche est le seul moyen pour valider et conclure à l'efficacité d'un biomatériau. Il implique, par là même, l'emploi des espèces cibles (cheval) comme animal expérimental..

Réduction. La taille des lots expérimentaux est réduite aux impératifs statistiques (6 animaux au total).

Raffinement. Le protocole chirurgical est standardisé et assure une mise en place sans conséquences sur l'état général des animaux. Les chirurgies sont pratiquées sur cheval anesthésié et placé en décubitus dorsal. En postopératoire, pendant au moins deux semaines, les animaux seront examinés et soignés bi-quotidiennement par un vétérinaire. Un examen quotidien sera assuré durant une période adaptée pour atteindre une récupération totale par les animaux. Afin de réduire le stress, les animaux resteront sous surveillance étroite d'un vétérinaire, avant d'être réintégrés dans leur paddock avec leurs congénères habituels.

Le Cheval est ici non seulement un modèle expérimental pour obtenir des données prédictives du des résultats de la technique et des biomatériaux utilisés, mais également un patient pouvant bénéficier lui-même des apports de ces techniques de médecine régénérative.

7487 L'acidose ruminale subaiguë est une pathologie digestive fréquemment rencontrée en élevage de ruminants laitiers soumis à des régimes à haute valeur énergétique. A l'opposé de l'acidose aiguë, son diagnostic est difficile car les signes cliniques sont discrets voire inexistants. Ce désordre digestif impacte sévèrement le microbiote ruminal entraînant une consommation erratique de la ration associée à une moindre valorisation des aliments, notamment via l'altération de la fonction fibrolytique du rumen.

Un moyen actuel de diagnostic de l'acidose subaiguë est le suivi en continu du pH intra-ruminal afin d'observer ses variations et d'estimer le temps passé par jour en dessous des normales physiologiques (pH<6). Cependant, cette technique est difficilement applicable en routine sur le terrain car très chère et difficile à mettre en place. C'est pourquoi, dans cette expérimentation nous souhaitons développer et/ou valider une méthode qui pourrait être adaptée au diagnostic sur le terrain de ce désordre digestif. D'une part, notre objectif est d'explorer des indicateurs périphériques novateurs reflétant cette pathologie. D'autre part, nous tenterons de mettre en évidence une combinaison d'indicateurs permettant de révéler une signature biologique des variations de l'activité dans le rumen.

Objectif : Explorer in-vivo des marqueurs issus de compartiments périphériques facilement échantillonnables et non invasifs pour l'animal dans des conditions d'alimentation discriminantes (challenge acidogène) et utilisées en fermes commerciales.

Animaux d'expérimentation : Concernant l'application de la règle des 3R, en l'état actuelle nous ne pouvons pas nous soustraire l'utilisation d'animaux. En effet l'acidose ruminale subaiguë est un désordre digestif fréquent chez les bovins en production laitière. Aucun modèle in vitro / in silico n'est actuellement disponible permettant de reproduire de façon fiable et précise ce désordre. Les effectifs animaux ont été limités au maximum ainsi l'étude sera conduite sur 10 vaches laitières primipares en lactation de race Holstein. Les animaux seront conduits en un seul lot sur différentes périodes afin que chaque animal soit son propre témoin. Tous les animaux seront équipés d'un bolus intra-ruminal pour le suivi des paramètres fermentaires indispensables à notre étude (pH et température). Ces dispositifs nous permettent d'éviter des prélèvements trop nombreux et de réduire le nombre d'animaux appareillés d'une canule ruminale. Ainsi, seule la moitié des animaux (5/10) sera équipée d'une fistule ruminale pour permettre des prélèvements de contenu digestifs indispensables à la caractérisation de l'état d'acidose subaiguë. Concernant, le raffinement des animaux, afin de réduire le stress généré, l'intervention se fait dans le calme par un expérimentateur ou un animalier expérimenté qui intervient quotidiennement sur ces animaux. Le personnel est qualifié et formé à ce prélèvement. Une attention particulière a été portée aux conditions d'hébergement (= condition d'élevage). Celles-ci seront maintenues en groupe durant l'expérimentation afin de respecter leur comportement social. Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour leur état et leur comportement. De plus, ce dispositif expérimental est adapté en terme statistique pour identifier des marqueurs périphériques de l'acidose ruminale subaiguë.

7488 Le muscle, outre sa fonction locomotrice, est le principal réservoir d'acides aminés mobilisables pour assurer la survie de l'organisme en cas de situations pathologiques. La préservation du capital musculaire contribue au maintien de la bonne santé.

La masse musculaire dépend d'un équilibre entre la synthèse et la dégradation des protéines sous la dépendance directe de l'apport en acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. Un déséquilibre, lié à une pathologie ou au vieillissement, entre les vitesses de synthèse et de dégradation protéique entraîne une fonte musculaire. Si les causes peuvent être différentes, il a été systématiquement observé une diminution de l'effet anabolique du repas, même si celui-ci contient l'apport protéique conseillé. Ceci s'explique par la mise en place d'une résistance de la synthèse des protéines musculaires à l'effet stimulateur des acides aminés issus de la digestion des protéines alimentaires. En d'autres termes, dans ces situations, il faut apporter plus d'acides aminés et donc générer une aminoacidémie plus importante suite à l'absorption d'un repas (phase postprandiale) pour créer un effet anabolique similaire à celui obtenu chez un individu dont le capital musculaire est normal et non-résistant.

Jusqu'à présent, la majeure partie des études se sont focalisées sur l'apport de protéines à digestion rapide générant rapidement d'importantes aminoacidémies et à forte teneur en leucine. Ces études

ont montré que l'hyperaminoacidémie est un levier important pour restimuler la synthèse des protéines quand celle-ci devient moins sensible à la prise alimentaire et ceci quel que soit la situation physiopathologique étudiée.

Le maintien de la masse protéique musculaire ou la récupération de son capital musculaire après un état d'atrophie dépend donc de la capacité des acides aminés alimentaires à stimuler de façon maximale l'anabolisme protéique (hyperaminoacidémie adaptée). Un autre facteur prépondérant dans le gain de masse musculaire est la durée pendant laquelle l'anabolisme va être présent et efficace pour générer une accrétion (gain net) protéique dans les muscles. Plus la période d'accrétion protéique postprandiale sera longue, plus les protéines alimentaires seront efficaces pour la synthèse musculaire.

Ce projet fait suite à un autre projet dans lequel nous avons proposé des stratégies innovantes pour palier à la résistance anabolique à l'effet du repas. Ces stratégies étaient basées sur l'étude de l'effet cinétique de protéines lentes ou rapides (caséine vs lactosérum ou protéines végétales) et la modification cinétique des apports énergétiques. Nous avons montré que la protéine à digestion lente (caséine) ne permet pas de stimuler la synthèse protéique musculaire chez le rat âgé et confirmé ainsi la résistance anabolique à l'effet du repas déjà observée. Les deux autres régimes testés ont permis de contrecarrer la résistance anabolique en permettant une stimulation de la synthèse protéique musculaire. Cependant, même si l'intensité de la réponse semble identique, elle se produit à des temps différents et il semble que les effets des protéines alimentaires soient médiés par des facteurs ou voies de signalisation différents.

L'objectif de ce nouveau projet sera de comparer l'intensité et la cinétique de l'effet anabolique de différents régimes contenant des protéines végétales seules ou en mélange avec du lactosérum.

Le modèle choisi est le rat Wistar âgé (20 mois) connu pour présenter une résistance anabolique.

Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R pour l'expérimentation animale. Nous ne pouvons pas remplacer cette expérimentation animale par une expérimentation *in vitro* ou *ex vivo*. Le vieillissement est une condition physiologique impossible à reproduire sur des modèles expérimentaux plus simples comme la culture de tissus ou de cellules. La dimension intégrant la complexité des interactions entre tissus et organes est donc également importante, ce qui ne se retrouve que chez les animaux vivants. L'utilisation d'animaux vivants âgés est la seule option possible. Mais nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux utilisés en optimisant le nombre d'animaux par lots. Nous mettrons en œuvre des méthodes pour limiter au maximum la douleur chez nos animaux, en utilisant des cages adaptées, en utilisant une anesthésie avant euthanasie et en surveillant quotidiennement les animaux afin de prendre rapidement des décisions d'exclusion d'animaux en souffrance.

Le projet prévoit la mise en place d'une intervention nutritionnelle chez le rat âgé (n= 180) afin de caractériser les effets de sources protéiques optimisées sur le maintien de la masse musculaire. In fine, l'étude proposée permettra l'élaboration d'une formulation protéique à teneur optimisée en protéines végétales afin d'améliorer l'anabolisme musculaire postprandial et ainsi limiter la fonte musculaire liée à l'âge.

7489 Ce projet s'inscrit dans le cadre d'une formation continue dispensée à des professionnels réalisant des expérimentations sur l'animal souhaitant valider leurs compétences de base concernant la manipulation et l'utilisation des rongeurs. Alors que ces professionnels possèdent toutes les autorisations pour réaliser ces études, ils souhaitent revalider leur savoir-faire au cours d'une formation pratique et rapide auprès de personnels qualifiés travaillant au quotidien avec des animaux. L'objectif est d'assurer la réalisation d'expérimentations de qualité tout en garantissant le bien-être des animaux.

La formation « Méthodes de base de préhension, administration et prélèvement d'échantillons chez le rat et la souris » est d'une durée de 14h (2 jours), composée essentiellement de travaux pratiques. Elle sera réalisée en 2 sessions d'une journée chacune, la première sur le rat et la deuxième sur la souris.

Le programme de formation est le suivant :

1. Ethique et respect du bien-être des animaux (lors de la session 1) :

- Visite du laboratoire.
- Rappel des règles d'éthique en matière d'entretien et de manipulation des animaux utilisés à des fins d'expérimentation.
- Règles éthiques supplémentaires non prévues par la réglementation et appliquée au sein du laboratoire permettant d'améliorer le bien-être des animaux, notamment dans le cadre d'études comportementales (cycle lumineux inversé, respect de la chronobiologie, besoins comportementaux élémentaires, enrichissement, savoir se comporter de manière adéquate avec les rongeurs).
- Règles éthiques en matière d'administration de traitement et de prélèvements (volumes, matériels, etc).
- Rappel des conditions d'euthanasie des animaux.

2. Déplacer et manipuler les animaux en réduisant le stress (lors de la session 1).

3. Apprentissage des différentes méthodes d'administration d'une substance et applications pratiques chez le rat (session 1) : gavage, intraveineuse (veine caudale), intramusculaire, sous-cutanée, intrapéritonéale et intracardiaque sur animaux anesthésiés (plus rappel des principes généraux d'anesthésie) et chez la souris (session 2) : gavage, intraveineuse, intrapéritonéale et intracardiaque sur animaux anesthésiés.

4. Prélèvements de sang par voie IV à la veine de la queue du rat sur tubes et traitement des échantillons (session 1).

5. Dissection d'un rat et d'une souris et méthodes de prélèvements d'organes (sessions 1 et 2).

6. Méthodes de fixation des organes prélevés (sessions 1 et 2).

L'ensemble des aspects réglementaires, éthiques et pratiques de la réalisation de ces procédures sera rappelé de façon théorique en début de formation lors de la session 1.

Un total de 20 rats et 20 souris sera utilisé dans ce projet : 4 rats et 4 souris seront utilisés par le formateur pour la démonstration des différentes méthodes de traitement et de prélèvement et 16 rats et 16 souris seront utilisés par les 4 personnes à former. Les animaux seront hébergés dans des cages standard répondant aux besoins de chaque espèce et avec un dispositif d'enrichissement de leur milieu adapté également à leur espèce (Raffinement). Au cours de la formation, les rats et les souris seront observés afin d'isoler, voire d'euthanasier de façon éthique, tout animal montrant des signes de souffrance.

A la fin du projet, si les animaux ont été anesthésiés au cours d'une procédure, ils seront euthanasiés au cours de l'anesthésie par le formateur. Pour les procédures au cours desquelles les animaux restent conscients, les animaux seront conservés pour une utilisation dans un autre projet interne de formation avec procédure sans réveil dans un objectif de réduction du nombre d'animaux (Réduction).

Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour ce type de formation, l'objectif étant pour les personnes formées de réaliser l'ensemble des gestes techniques enseignés lors des expériences qu'ils auront à mener chez le rat et la souris à l'issue de cette formation (Remplacement).

7490 La cicatrisation des plaies cutanées est un phénomène naturel de reconstruction de la barrière cutanée mais si les plaies sont mal soignées, cela peut aboutir à des complications. La cicatrisation cutanée fait intervenir différentes phases qui entraînent la disparition de la lésion et le remplacement des cellules atteintes par des cellules saines. On distingue 4 stades dans le processus de cicatrisation des plaies cutanées, faisant suite à une phase inflammatoire au cours de laquelle la lésion est recouverte par un caillot sanguin : (1) l'angiogenèse avec formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistants par bourgeonnement et permettant l'apport en nutriments et oxygène, indispensables aux cellules, (2) la phase de migration au cours de laquelle le caillot sanguin devient une croûte en raison de la prolifération des filaments de fibrine, c'est le début de l'élaboration de la cicatrice, et sous la croûte les vaisseaux vont proliférer, (3) la phase de prolifération, massive, de cellules, de vaisseaux sanguins et de fibres, et enfin (4) la phase de maturation, phase la plus

longue qui peut se poursuivre pendant plus d'un an, avec au début la croûte qui tombe et la peau qui va retrouver ses différentes couches.

Il est donc très important de tester de nouvelles substances, de nouveaux pansements ou de nouveaux dispositifs médicaux sur des modèles de plaies simples et chroniques représentatifs chez l'animal qui pourront être utilisés par la suite chez l'Homme et ainsi permettre d'améliorer la cicatrisation de ces plaies. Parmi ces nouveaux produits, il y a des composés pouvant être appliqués directement sur les plaies cutanées et se présentant sous forme liquide, de crème, de pommade ou encore de gel, et également des produits pouvant être administrés directement par voie orale.

L'objectif de notre projet est d'évaluer les effets d'un produit, administré sous 2 formulations différentes, par application cutanée ou par administration orale, sur la cicatrisation sur le modèle de plaie cutanée induite par incision cutanée chez la souris Hairless Skh-1 car ce type d'étude ne peut être effectué sur des modèles *in vitro* (remplacement). Ce produit contient une substance active favorisant la cicatrisation et possédant également un effet analgésique permettant ainsi de supprimer la douleur éventuelle liée à la plaie induite.

Pour ce projet nous utiliserons 16 souris femelles Hairless Skh-1 âgées de 6 semaines. Après une période de quarantaine et d'acclimatation de 7 jours, les plaies cutanées seront induites, sous anesthésie gazeuse, par incision cutanée sur les flancs gauche et droit de l'ensemble des animaux (Procédure 1). Chaque groupe expérimental sera ainsi composé de 4 souris avec 2 plaies cutanées induites sur les flancs gauche et droit de chaque souris afin de réduire le nombre d'animaux utilisés mais permettant d'avoir un nombre suffisant de plaies, 8 par groupe expérimental, pour mesurer les effets des 2 formulations du produit testé (réduction).

Le produit à tester sera soit appliqué directement sur les plaies cutanées induites sous forme de gel, en comparaison avec un gel neutre dépourvu du produit à tester, soit administré par voie orale sous forme de solution aqueuse, en comparaison avec un véhicule neutre dépourvu du produit à tester. Les 2 formulations seront appliquées ou administrées quotidiennement après induction des plaies cutanées jusqu'à cicatrisation complète des 2 plaies cutanées d'une même souris (Procédure 2).

Des paramètres seront mesurés et scorés quotidiennement au niveau des plaies cutanées induites jusqu'à cicatrisation complète : longueur, largeur et boursoufflement de la plaie, présence d'une croûte sur la plaie et visibilité de la plaie, ainsi que le temps nécessaire à la cicatrisation complète de chaque plaie cutanée induite (Procédure 3).

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation, leur poids sera mesuré 3 fois par semaine et si une perte de poids supérieure à 20% par rapport au poids maximal est observée ou si des signes d'infection de la plaie ou des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ceux-ci seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

A la fin de l'expérimentation, l'ensemble des animaux sera euthanasié par injection intrapéritonéale d'une surdose d'anesthésique et des prélèvements cutanés seront effectués au niveau des zones d'induction des plaies cutanées pour la réalisation d'analyses biologiques.

7491 La kératose actinique est une lésion cutanée développée à partir des kératinocytes, cellules constituant 90 % de la couche superficielle de la peau (épiderme), est dont les deux facteurs de risque principaux sont l'exposition solaire avec les rayonnements ultraviolets de type B ou UVB, ainsi qu'une peau sensible, personnes ayant une peau et des yeux clairs, sujets blonds et roux. La meilleure prévention est une protection solaire efficace.

Une kératose actinique se traduit par un épaississement de la couche cornée de l'épiderme aux endroits du corps exposé au soleil pendant une période prolongée et son incidence augmente avec l'âge. Elle est considérée comme précancéreuse et peut évoluer de différentes manières : elle peut

se résorber spontanément, persister ou augmenter de volume plus ou moins rapidement. Dans 16 à 20 % des cas, elle peut évoluer vers un cancer cutané.

Différents traitements locaux sont possibles en fonction de la localisation, des caractéristiques du patient et de celles de la kératose actinique : cryothérapie, chirurgie, laser, curetage et électrocoagulation, thérapie photodynamique, gel au diclofenac, à l'ingénol mébutate, crèmes à l'imiquimod ou au 5 Fluorouracil. Cependant les effets indésirables varient en fonction du type de kératose actinique et de la durée des traitements nécessaires.

Le but de ce projet est d'étudier la courbe dose réponse et de la cinétique après une ou plusieurs applications du peptide P9X à différentes doses chez la souris afin d'étudier par la suite son efficacité sur la prévention et le traitement de la kératose actinique. Ce peptide pourrait en effet constituer un nouveau traitement pour lutter contre cette pathologie cutanée.

Nous utiliserons 360 souris femelles Hairless Skh-1 âgées de 6 semaines pour ce projet, en 3 parties :

- une première étude sera effectuée sur 72 souris pour étudier la courbe dose réponse du peptide P9X à 24 heures. Les souris seront réparties en 12 groupes de 6 souris chacun sur la base du poids, 3 groupes contrôle (aucun traitement, traitement avec le véhicule et traitement avec le peptide neutre), et 9 groupes traités avec le peptide P9X à 9 doses croissantes D1 à D9. Une seule application cutanée sera effectuée sur le dos des animaux qui seront euthanasiés au bout de 24 heures. La totalité de la peau de la zone traitée sera prélevée pour la réalisation d'analyses biochimiques.

- Une deuxième étude sera effectuée sur 72 souris pour étudier la cinétique simple dose du peptide P9X. Les souris seront réparties sur la base du poids en 1 groupe contrôle sans aucun traitement de 6 souris et 5 groupes de 30 souris chacun : 2 groupes contrôle traités avec le véhicule et avec le peptide neutre et 3 groupes traités avec le peptide P9X à 3 doses définies selon les résultats de la première étude. Une seule application cutanée sera effectuée sur le dos des animaux qui seront euthanasiés au bout d'1 heure, 8 heures, 24 heures, 48 heures ou 72 heures avec 6 animaux par temps d'euthanasie. Les 6 animaux du groupe contrôle sans aucun traitement seront euthanasiés au temps 72 heures des autres animaux traités. La totalité de la peau de la zone traitée sera prélevée pour la réalisation d'analyses biochimiques.

- La troisième étude sera effectuée sur 132 souris pour étudier la cinétique après applications multiples du peptide P9X. Les souris seront réparties sur la base du poids en 1 groupe contrôle sans aucun traitement de 6 souris et 7 groupes de 18 souris chacun : 1 groupe contrôle traité quotidiennement pendant 7 jours avec le véhicule, 2 groupes traités soit quotidiennement pendant 7 jours, soit tous les 2 jours pendant 7 jours (J1, J3, J5 et J7) avec le peptide neutre et 4 groupes traités soit quotidiennement pendant 7 jours, soit tous les 2 jours pendant 7 jours (J1, J3, J5 et J7) avec le peptide P9X à 2 doses définies selon les résultats de la deuxième étude. Les applications cutanées seront effectuées sur le dos des animaux qui seront euthanasiés à 3 temps différents déterminés selon les résultats de la deuxième étude. Les 6 animaux du groupe contrôle sans aucun traitement seront euthanasiés au troisième temps d'euthanasie des autres animaux traités. La totalité de la peau de la zone traitée sera prélevée pour la réalisation d'analyses biochimiques.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser les traitements pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant d'étudier la courbe dose réponse et la cinétique après une ou plusieurs applications d'un composé sur un organisme entier (Remplacement) mais nous utiliserons le nombre minimum d'animaux mais suffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Plusieurs observations quotidiennes avant et après traitement et des pesées régulières seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises...) entrainera la sortie d'étude et l'euthanasie des animaux par une méthode réglementaire, selon les recommandations éthiques.

7492 Le but de nos travaux est d'identifier des peptides ou des nutriments capables de diminuer le risque de maladies osseuses, notamment l'ostéoporose. Contrairement à un modèle classique d'ostéoporose nécessitant une ovariectomie, nous avons développé un modèle qui consiste à faire consommer à des souris Balb/c spécialement élevées pour l'expérimentation animale, des régimes à faible teneur en protéines (6% de protéine de soja). Ces animaux présentent une perte de densité minérale osseuse, une réduction de la longueur des fémurs et une altération de la microarchitecture osseuse. Toutes ces altérations sont corrélées à une diminution de la formation osseuse. Ces altérations ne sont pas visibles si le régime inclut 20% de protéine de soja ou 6% de caséine. Ce modèle est bien adapté pour l'étude des effets de différents peptides sur le métabolisme osseux. Nous faisons l'hypothèse que l'augmentation de la biodisponibilité de certains acides aminés puisse jouer un rôle important et plus particulièrement en situation de dénutrition protéique. Les peptides testés sur notre modèle animal auront été dans un premier temps sélectionnés à l'aide d'un modèle *in vitro* (culture primaires de cellules osseuse) qui nous aura permis de démontrer l'efficacité des peptides sur le métabolisme osseux et ainsi de diminuer le nombre d'animaux utilisés ultérieurement.

Dans la mesure où le but final du projet est la mise au point d'un produit qui sera ingéré à dose nutritionnelle chez l'Homme, il convient de tester l'effet des peptides sélectionnés sur un modèle animal. Ces études permettront de vérifier que l'ingestion des peptides choisis est capable de stimuler *in vivo* les ostéoblastes et de favoriser la synthèse osseuse.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous testerons environ 10 peptides à 5 concentrations différentes afin de définir les conditions optimales. Chaque étude inclura 84 animaux, soit un total de 840 souris sur 5 ans.

Ces expériences seront menées dans le respect du bien-être animal. Le nombre d'animaux utilisés, 84 souris par test soit 12 souris par groupe, est le minimum exigé pour l'analyse statistique des paramètres mesurés et nous avons veillé à nous limiter aux seules expériences considérées comme indispensables. Les conditions d'hébergement en cage individuelle transparente seront améliorées par enrichissement du milieu (maisonnettes). Au cours de l'expérimentation (90 jours) nous évaluerons la densité minérale osseuse par densitométrie sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane. Un prélèvement de sang à la queue par des personnes expérimentées sera effectué à mi-parcours afin d'évaluer les marqueurs du métabolisme osseux. A la fin de l'expérimentation les animaux seront euthanasiés afin d'analyser les répercussions des régimes sur la qualité des os. Les résultats de ce projet de recherche pourront permettre de développer de nouveaux compléments alimentaires appropriés pour le maintien de la santé osseuse chez les populations souffrant de dénutrition protéique.

7493 L'un des défis majeurs pour assurer le succès de la thérapie génique quelle que soit la maladie traitée, est la nécessité d'apporter le gène thérapeutique spécifiquement aux cellules cibles pour chaque maladie. Depuis de nombreuses années, les vecteurs recombinants Adeno-associés ou rAAV ont été utilisés en thérapie génique car ils assurent un transfert de transgènes thérapeutiques sûr et efficace dans différents tissus et organes. Cependant, l'administration unique d'un rAAV induit une réaction immunitaire humorale persistante contre la capsid du vecteur au sein de l'organisme traité, ce qui compromet la possibilité de réaliser une deuxième administration, parfois nécessaire pour assurer une continuité d'expression du transgène dans le temps et l'espace.

Pour tenter de répondre à ce défi, des agents pharmacologiques utilisés comme immunomodulateurs ont été développés, mais leur application et leur efficacité sont encore limitées. Ainsi, une nouvelle stratégie pour pallier cette immunité anti-capsid a été développée et est basée sur l'utilisation de nanoparticules rapamycine (SVP pour Synthetic Vaccine Particule). La co-administration de SVP et du vecteur recombinant rAAV8 a complètement bloqué les réactions immunitaires anti-AAV au cours d'études menées chez la souris et a permis la réadministration du vecteur pour obtenir des niveaux d'expression thérapeutiques continus du transgène d'intérêt.

Des études de même nature menées chez le primate non-humain (PNH) ont montrés des résultats similaires et de façon sûre et efficace. En outre, nous avons récemment coadministré des SVP, associés à différents sérotypes de rAAV (capsides de natures différentes), nommés Spark200, conçu pour cibler les cellules hépatiques humaines chez des souris. Afin de pouvoir ensuite transposer les résultats obtenus chez l'homme, nous voudrions conduire une étude pilote chez le macaque

fascicularis utilisant 3 doses différentes de SVP (étude de dose) ainsi que différents calendriers d'administration afin de déterminer la posologie et la séquence d'administration conduisant au blocage complet des réactions immunitaires humorales à l'AAV, afin de permettre la re-administration du vecteur.

De plus, au cours de cette étude, nous souhaitons administrer le vecteur + SVP à des animaux qui seront faiblement séropositifs à l'AAV8, dans un le but de vérifier si notre stratégie a un impact sur des anticorps préexistants.

Le système immunitaire humain est un réseau extraordinairement complexe de cellules, protéines, molécules signal et mettant en jeu de nombreuses boucles de rétro-contrôles, qui reste à ce jour trop complexe et pas complètement compris pour être reproduits in silico ou in vitro. Pour atteindre les buts de l'étude proposée ici, nous devons étudier la cinétique de la réponse immune anti-AAV dans un système immunitaire mammifère complet. Etant donné que le système immunitaire des primates non-humains est très proche de celui de l'homme, les résultats de l'évaluation des paramètres d'efficacité et sécurité pourront être extrapolés de façon significative.

Cette étude prévoit d'inclure 12 primates : 9 seront séronégatifs pour les vecteurs rAAV8 administrés et 3 seront faiblement séropositifs. Les animaux recevront, sous anesthésie, une administration conjointe de rAAV et de SVP par voie intraveineuse, 2 fois à 30 jours d'intervalle, selon les groupes suivants :

-Groupe 1 : "split dose", 3 macaques recevront les SVP à la dose de 6 mg/kg répartie sur 2 jours (J-1 et J1 puis J29 et J30) et le vecteur rAAV8 porteur du transgène hFVIII à J1 et J30

-Groupe 2 : faible dose ("Low"), 3 macaques recevront les SVP à la dose de 9 mg/kg et le vecteur rAAV8-hFVIII à J1 et J30

-Groupe 3 : haute dose ("high"), 3 macaques recevront les SVP à la dose de 12 mg/kg et le vecteur rAAV8-hFVIII à J1 et J30

-Groupe 4 : haute dose ("high") et faiblement séropositif à l'AAV8, 3 macaques recevront les SVP à la dose de 9 mg/kg et le vecteur rAAV8-hFVIII à J1 et J30

Le protocole d'administration se déroule sous anesthésie générale et consiste en une injection par voie intraveineuse des rAAV et des SVP au niveau d'une veine saphène des primates au débit maximum de 10 ml/kg/h, 2 fois à 30 jours d'intervalle. Les 12 animaux seront ensuite suivis durant 26 semaines post injection, au terme desquelles ils seront euthanasiés pour prélèvements post mortem. Au cours de cette étude, des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie, via une ponction au niveau de la veine fémorale, en pré-injection puis en post-injection à différents time-points pour permettre un suivi des paramètres hématologiques et biochimiques d'intérêt chez tous les macaques et d'évaluer la réversibilité, la persistance ou l'apparition d'effets toxiques retardés et d'évaluer l'expression du transgène (hFVIII) aussi bien que l'apparition d'anticorps anti-capside. Des prélèvements d'urines (sur plateaux) seront également réalisés au cours de cette étude aux mêmes time-points, ainsi que des prélèvements de moelle osseuse juste avant l'euthanasie (pour frottis).

La constitution des groupes (3 animaux/groupe) est basée sur notre expérience, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Afin d'interpréter les résultats de l'étude, plusieurs tests statistiques seront utilisés pour comparer les différents groupes : test de Student et test non paramétrique de Mann-Whitney. Une analyse de la variance (ANOVA) sera également utilisée pour comparer les résultats des différents paramètres mesurés au cours du temps au sein des différentes cohortes.

Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale par injection intraveineuse à D0 et D30 se déroulera sous anesthésie générale (fixe avec relai gazeux). Les prélèvements sanguins seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min.). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures. Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 quand cela est possible (hors période de suivi post opératoire).

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre. Le Centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités (suivies via un cahier d'enrichissement) : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat (miroirs et chaînes pour favoriser les déplacements verticaux...).

7494 Les troubles neurologiques d'origine infectieuse chez le cheval représentent un véritable défi diagnostique ; 15 à 20% des affections nerveuses sont d'origine infectieuse, mais dans plus de 50% des cas suspects d'encéphalite infectieuse, aucun pathogène courant (herpès virus équin de type 1, virus West Nile...) n'est mis en évidence. Dans le cadre du sous-réseau syndrome nerveux du RESPE, de 49 à 85 pathologies nerveuses par an ont été enregistrées depuis 2011. Avec une approche de séquençage à haut débit, nous avons cherché à caractériser les pathogènes présents dans le tissu nerveux ou le liquide cérébro-spinal de quelques cas suspects de méningo-encéphalite d'origine infectieuse inconnue et déclarés au RESPE. En juillet 2014, un trotteur de 4 ans a présenté une hyperthermie forte (41°C), un abattement marqué, un ictère et des troubles nerveux d'évolution aigue. Les ARN présents dans des échantillons de cortex de cet animal ont été séquencés et l'assemblage des séquences produites a permis de reconstituer le génome complet d'un rotavirus. Le rotavirus identifié est génétiquement proche des rotavirus de type A aviaire. Le caractère infectieux du rotavirus identifié a été confirmé par des essais d'isolement viral en culture cellulaire. Toutes les données obtenues permettent de confirmer l'infection de ce jeune cheval par un nouveau rotavirus de type aviaire, présentant un tropisme inhabituel pour le système nerveux central. Nous proposons ici d'évaluer les propriétés neurovirulentes et la pathogénicité de cet isolat viral par rapport à un isolat aviaire classique, PO-13 pour les mammifères. Un modèle murin, la souris Balb/cJ, déjà décrit dans la littérature scientifique, sera utilisé. 7 groupes de 6 souris femelles Balb/cJ de 3 semaines seront constitués, incluant un groupe témoin, 3 groupes pour une infection avec l'isolat récent de rotavirus aviaire et 3 groupes pour une infection avec l'isolat classique PO-13. Trois voies d'inoculation seront utilisées : la voie orale, mimant l'infection naturelle par un rotavirus, la voie intra-péritonéale pour une infection périphérique, ces deux premières voies permettant d'évaluer le potentiel neuroinvasif des deux isolats de rotavirus, ainsi que la voie intracrânienne permettant d'évaluer la neurovirulence des souches. Un suivi clinique, virologique et immunologique sera assuré pendant deux semaines après infection virale.

La détermination du pouvoir pathogène d'un virus ne peut être caractérisée que chez des mammifères sensibles, en effet cette virulence, notamment la neurovirulence fait intervenir de nombreux systèmes qui ne peuvent être reproduits par des cultures cellulaires. Le nombre de 6 animaux par groupe expérimental est le minimum pour déterminer une virulence dans les cas où celle-ci n'est pas systématique mais touche entre 30 et 50% des animaux infectés. Enfin une surveillance biquotidienne des animaux permettra de les euthanasier avant que l'évolution de la maladie n'entre dans une phase douloureuse ou agonique.

7495 La mesure de la production de méthane par la fermentation des aliments dans le rumen est d'une importance majeure, afin de réduire les émissions de gaz à effet de serre liée aux activités d'élevage de ruminants. Face à une forte demande d'expérimentation *in vivo* de la part des bailleurs de fonds (Union Européenne, ANR, secteur privé), il est nécessaire de chercher des méthodes de mesure peu contraignantes pour l'animal. La méthode de référence (enceintes semi-ouvertes) limite les déplacements de l'animal pour une durée de quelques jours. Cette méthode sera comparée à des méthodes non contraignantes : marqueur SF6, « greenfeed » et détecteur laser. Les précisions respectives et de ces différentes méthodes et leurs conditions optimales d'emploi n'ont jamais été comparées. Les objectifs de cet essai sont 1) de déterminer si les deux méthodes non contraignantes peuvent être utilisées en recherche en garantissant une précision suffisante ; 2) quel est le nombre optimal d'animaux à utiliser avec chacune des 4 méthodes. Cette expérimentation est menée sur deux types de ruminants : vaches taries et taurillons en croissance. Le choix des bovins a été fait parce qu'ils représentent plus de 90% des émissions de méthane entérique en France. L'utilisation de ces deux types d'animaux fournira des résultats complémentaires. D'une part les vaches taries, animaux à faibles besoins alimentaires, seront utilisés pour étudier la répétabilité des mesures entre animaux

et au cours du temps, d'autre part les taurillons, animaux en production à besoins plus élevés, permettront d'évaluer si la précision des mesures dépend du niveau d'ingestion des animaux et de la quantité de méthane produite par jour.

Concernant l'application de la règle des 3R, nous ne pouvons pas nous soustraire à l'utilisation d'animaux car la quantification de la production de méthane entérique des ruminants nécessite l'utilisation de ruminants. Les effectifs animaux ont été limités au maximum, l'étude sera conduite sur 8 vaches laitières taries de race Holstein et 16 taurillons en croissance soit 24 animaux à l'échelle du projet. Les animaux seront conduits en lot sur différentes périodes (hors périodes de passage en enceinte). Concernant, le raffinement des animaux, il n'y a pas de prélèvement à proprement parler. Le flux de gaz passant dans l'enceinte est mesuré automatiquement par un flux-mètre. Les prélèvements de gaz sont réalisés en sortie de l'enceinte. Ces mesures sont réalisées sans contact avec l'animal. Une attention particulière a été portée aux conditions d'hébergement (= condition d'élevage). Celles-ci seront maintenues en groupe durant l'expérimentation afin de respecter leur comportement social. Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour leur état et leur comportement.

7496 Le syndrome de l'intestin irritable (SII) représente une pathologie fonctionnelle très commune (10-15% de la population dans les pays développés) et une cause majeure de consultations médicales dans le monde occidental. Les symptômes principaux sont représentés par la douleur viscérale et une altération de la motricité intestinale (diarrhée, constipation ou les deux conditions alternées). Bien que l'étiologie du SII ne soit pas clarifiée, la recherche a mis en évidence une altération de la barrière intestinale (augmentation de la perméabilité intestinale). De plus, chez les patients, le stress chronique est reconnu comme un important facteur de risque impliqué dans l'initiation et l'aggravation des principaux symptômes.

Ainsi notre projet vise à évaluer l'efficacité des substances pharmacologiques sur des modèles SII-like précliniques afin de développer des nouvelles pistes de traitement de cette pathologie. Pour ce projet d'une durée de 5 ans, un total de 5040 animaux seront nécessaires (4480 souris et 560 rats mâles adultes) pour évaluer l'efficacité des substances muco-protectrices sur la diarrhée ainsi que la perméabilité intestinale et la sensibilité viscérale en condition de stress chronique. L'utilisation du modèle souris et rat se justifie par le nombre important d'études bibliographiques et d'outils méthodologiques utilisant ces modèles pour étudier cette pathologie qui ne peut être étudiée sur des modèles *in vitro*. Les souris et rats dans cette étude sont des animaux sains provenant d'un élevage agréé. Ils sont hébergés dans notre établissement dans des conditions normalisées optimales, et suivis quotidiennement pour leur apporter tous les soins nécessaires et leur assurer un haut niveau de bien-être. Chaque intervention sur l'animal nécessite une observation constante de la part de l'opérateur et est réglée en envisageant des temps de récupération et pour réduire au minimum le stress. Pendant et après la chirurgie, des précautions sont prises pour éviter l'infection, l'hypothermie les animaux et la déshydratation afin qu'ils récupèrent le mieux possible. Les animaux opérés sous anesthésie sont observés pendant toute la durée du protocole expérimental pour vérifier l'état des points de suture. La litière est régulièrement changée. Le comportement et l'état de santé physique des animaux seront suivis quotidiennement afin de pouvoir détecter précocement tous signes de souffrance. Tout a été mis en œuvre pour tenir compte des règles de réduction et raffinement. D'une part, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe expérimental a été limité en tenant compte de la variabilité interindividuelle qui nécessite d'avoir des effectifs suffisants pour atteindre une validité statistique. D'autre part, toutes les mesures ont été prises pour réduire l'inconfort, et prévenir toute douleur ou anxiété susceptible d'être subie par les animaux. Si malgré les mesures prises, une souffrance était constatée, la procédure serait arrêtée.

7497 Le TDAH est une maladie caractérisée par trois symptômes que sont les troubles de l'attention, l'hyperactivité et l'impulsivité. Malgré de nombreuses études réalisées en clinique, les causes neurobiologiques du TDAH demeurent inconnues. Dans ce contexte, l'utilisation de modèles animaux peut apporter des informations importantes pour mieux comprendre la physiopathologie de cette maladie.

Actuellement, le modèle animal le plus utilisé est une souche de rats spontanément hypertendus qui présentent les trois symptômes du TDAH. Grâce à ce modèle, nous avons précédemment déterminé

les régions du cerveau dont les dysfonctions seraient à l'origine des symptômes. L'objectif de cette étude est d'identifier les anomalies de neurotransmission à l'origine des perturbations de ces régions. Ceci sera réalisé par une étude de microdialyse intracérébrale dans ce modèle animal.

Au total, 58 rats seront utilisés pour cette étude : 10 rats serviront pour une expérience de mise au point des sites d'implantation des canules et 48 rats pour l'expérience proprement dite.

Remplacement : cette étude *in vivo* ne peut être substituée par une méthode alternative *in vitro* sur des cellules. Il s'agit d'étudier la libération de neurotransmetteurs directement dans le cerveau ce qui ne peut être réalisé qu'*in vivo*.

Raffinement : les animaux seront hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et une feuille de sopalin.

La douleur sera évaluée pendant la chirurgie, l'anesthésie sera contrôlée tout au long de la procédure de chirurgie (température corporelle, réflexes, rythme respiratoire).

Réduction : L'effectif de 58 rats (témoins inclus) correspond à l'effectif minimum pour pouvoir réaliser les tests statistiques.

7498 La toxicité est la mesure de la capacité d'une substance à provoquer des effets néfastes et mauvais pour la santé ou la survie chez toute forme de vie (animale telles qu'un être humain, végétale, fongique, bactérienne), qu'il s'agisse de la vitalité de l'entité ou d'une de ses parties (ex : foie, rein, poumon, etc. chez l'animal).

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

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

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

L'objet de ce projet d'une durée de 5 ans, validé par la Food and Drug Administration (FDA) aux Etats-Unis, sera réalisé selon les exigences des lignes directrices OCDE n° 423 et US EPA OPPTS 870.1100, et sera donc d'étudier la toxicité éventuelle de 72 composés naturels, administrés par voie orale en traitement unique à la dose limite de départ de 2000 mg/kg, selon l'annexe 2d de la ligne directrice OCDE n° 423. Ces études seront réalisées chez des rats femelles uniquement, celles-ci étant considérées comme étant plus sensibles que les mâles aux effets toxiques potentiels de substances (raffinement). Après mise à jeun la veille, les animaux sont traités par une administration orale unique de chacun des composés à tester. Les animaux sont ensuite observés et pesés régulièrement pendant les 14 jours suivants jusqu'à leur euthanasie. Etant donné qu'il s'agit d'études de toxicité, aucune médication ne peut être donnée aux animaux pour soulager leur souffrance. Par contre si un animal présente un niveau de souffrance trop important (tremblements importants, paralysie, immobilité associée à l'arrêt d'alimentation...), il est euthanasié en conformité avec les recommandations éthiques. Les animaux seront surveillés toutes les heures pendant 8 heures après l'administration intragastrique de chacun des 72 composés naturels à tester, puis deux fois par jour

au minimum au cours des 14 jours de suivi après l'administration intragastrique de chacun des 72 composés naturels à tester, week-end et jours fériés compris, afin de détecter tout comportement anormal ou atteinte de point limite.

Pour l'ensemble de ce projet sur une période de 5 ans, le minimum d'animaux nécessaires sera utilisé (réduction) : 432 rats au minimum et 1728 rats au maximum. Les animaux seront hébergés par 3 dans des cages transparentes (48x27x20 cm), sans autre enrichissement que l'enrichissement social et que la vision des congénères placés dans les cages avoisinantes. Si aucun effet toxique n'est observé après administration orale unique d'un des composés à tester à la dose limite de départ de 2000 mg/kg sur 2 séries de 3 animaux à une semaine d'intervalle (0 ou 1 rat mort, moins de 25% de perte de poids par rapport au poids maximum ou pas de modification importante du comportement pour les 2 séries de 3 rats utilisées), le produit est considéré comme non toxique et l'étude est terminée. Dans le cas contraire (2 ou 3 rats morts, perte de poids de plus de 25% par rapport au poids maximum ou modification importante du comportement pour 1 des 2 séries de 3 rats utilisées), des doses moins importantes de 300 mg/kg, puis éventuellement de 50 voire 5 mg/kg, seront testées, toujours sur 2 séries de 3 animaux à une semaine d'intervalle pour chaque dose à tester.

Ces études de toxicité aiguë ne peuvent pas être remplacées par des méthodes alternatives. Elles sont effectuées préalablement à la réalisation d'études de toxicité sub-chronique 90 jours sur ces mêmes 72 composés naturels, sachant que si des effets toxiques sont observés pour un ou plusieurs composés à la dose limite de départ de 2000 mg/kg, ce ou ces composés naturels ne seront pas testés dans les études de toxicité sub-chronique 90 jours.

L'enjeu social est donc de prouver l'absence éventuelle de toxicité de ces 72 composés naturels pour une utilisation future chez l'homme et d'un point de vue économique de permettre le développement de l'utilisation de ces 72 composés naturels par l'industrie agro-alimentaire.

7499 L'objectif de ce projet est d'évaluer la fonction auditive chez des rats Sprague-Dawley et des rats Brown-Norway. La finalité étant d'étudier les caractéristiques de l'audition du rat sur un modèle de migraine, il est important d'identifier la souche animale ayant la meilleure audition en termes de seuils de détection ainsi que de vérifier la stabilité de l'audition des rats au cours de leur vieillissement. L'audition peut être mesurée en utilisant des méthodes objectives non invasives. Ces méthodes sont basées sur l'enregistrement de l'activité électrique de divers relais de la voie auditive. Dans un premier temps il s'agit de mesurer les potentiels auditifs, ceux-ci reflètent l'activité de structures nerveuses impliquées dans le codage des sons. Cette mesure est réalisée par l'insertion d'une sonde dans l'oreille et d'électrodes sous la peau. Cela permet d'évaluer le potentiel du nerf auditif et le fonctionnement des noyaux relais du tronc cérébral.

La cochlée est l'organe périphérique de l'audition, située dans l'oreille interne et composée de cellules sensorielles ciliées permettant de coder les différentes fréquences. Les cellules ciliées de l'apex de la cochlée codent les basses fréquences et celles de la base codent les hautes fréquences. C'est pourquoi dans un deuxième temps nous procédons à l'enregistrement des otoémissions acoustiques. Cet enregistrement constitue une méthode d'évaluation des propriétés électromotiles des cellules ciliées en utilisant plusieurs fréquences différentes comme stimulation.

Cette étude auditive ne peut se faire que sur animal vivant. Nous utilisons 30 animaux séparés en deux groupes (15 rats mâles Sprague-Dawley et 15 rats mâles Brown-Norway), les tests sont réalisés à partir de leur 4ème semaine de vie jusqu'à leur 9ème mois, à une fréquence d'une mesure de potentiel auditif et d'otoémission acoustique par semaine. Nous utilisons le minimum d'animaux possibles pour avoir des résultats significatifs et prévoir d'éventuelles pertes (présence d'otites d'oreille moyenne qui entraînent une baisse d'audition). Pour évaluer l'audition, nous réalisons des tests fonctionnels sur animal anesthésié. Les tests sont non invasifs. Dès les premiers signes de réveil de l'animal, l'ensemble du matériel est retiré. Tous les animaux bénéficieront d'un suivi quotidien et tout signe de souffrance entraînera l'écartement de l'animal concerné de l'étude.

7500 Le but de ce projet est d'identifier de nouveaux traitements dans le syndrome de Gilles de la Tourette. Cette maladie est caractérisée par la survenue de Tics (mouvements moteurs incontrôlés), et de tocs ou pulsions à exécuter une action de façon répétée et incontrôlée. Elle apparaît souvent au cours de

l'adolescence et peut être très invalidante et aliénante pour les patients. La prévalence de cette maladie, ou nombre de personnes atteintes dans une population donnée est d'environ 1 sur 2000.

A l'heure actuelle, les seuls traitements qui semblent avoir des effets bénéfiques sont les antidépresseurs et les neuroleptiques. Des modèles animaux existent, qui reproduisent l'une ou l'autre des composantes : tics moteurs ou tocs et permettent d'étudier les effets bénéfiques potentiels de nouveaux médicaments. Ces modèles ne peuvent être substitués par des modèles cellulaires.

Le nombre d'animaux que nous prévoyons pour mener à bien ce projet est le nombre minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement analysables, selon les données de la littérature.

Plusieurs modèles de Gilles de la Tourette seront utilisés (4 modèles). Ces modèles sont induits par administration de différents composés.

Des tests comportementaux d'observation ou d'exploration dans l'espace seront menés sur ces différents modèles de Gilles de la Tourette pour tester les candidat-médicaments à l'étude. Pour chaque modèle, 2 doses du composé induisant le comportement de Gilles de la Tourette seront testées. En effet, les données de la littérature décrivent des comportements induits différents selon les doses de composés utilisées. Le candidat médicament peut avoir un effet sur la dose faible, et pas d'effet sur la dose plus forte, ou inversement, il est donc nécessaire de tester 2 doses pour chaque modèle. Chaque groupe a été réduit au minimum et sera constitué de 10 à 12 individus.

4 Modèles x 2 doses par modèle x 6 procédures (tests comportementaux) X 3 candidat-médicaments x 7 lots X 12 animaux = 12096 animaux (rats ou souris) au maximum sur une période de 5 ans. Ce nombre sera réduit au minimum, en particulier, les animaux pourront être inclus dans plusieurs procédures, ce qui réduira le nombre estimé d'animaux nécessaires au projet.

Selon les données de la littérature, les procédures de ce projet n'entraînent pas de souffrance physique chez l'animal. Au cas où celle-ci surviendrait, de même qu'un stress induit par une manipulation, des points limites ont été définis pour les réduire au minimum. De plus, les animaux seront hébergés en groupe, dans un environnement enrichi.

7501 L'adaptation des animaux face à des ressources alimentaires et non-alimentaires fluctuantes est un enjeu majeur pour la Région Bretagne. La Bretagne est la 1^{ère} région productrice de lait en France (20 % du total), et la filière laitière représente 20 % du chiffre d'affaire de l'agriculture des 4 départements bretons. Parmi les étapes d'élevage, la période la plus critique est l'élevage du jeune. Les conduites d'élevage des jeunes ruminants laitiers déterminent en partie leur niveau de production ultérieure. En élevage caprin, les difficultés à atteindre un poids vif supérieur à 32 kg lors de la mise à la reproduction amènent les éleveurs à augmenter l'apport alimentaire avant la puberté. Ces pratiques suscitent de nombreuses interrogations quant aux régimes à utiliser, aux périodes durant lesquelles les distribuer et sur les conséquences sur la reproduction et la production de lait. L'âge au sevrage est aussi un des critères important dans la conduite et la gestion des élevages caprins, aussi bien du point de vue technique qu'économique. Les connaissances acquises sur la physiologie, la nutrition et/ou la reproduction des animaux depuis plusieurs décennies, ne sont plus en phase avec le terrain du fait de l'évolution génétique des troupeaux. Les conséquences de changement de pratiques d'élevage sur le comportement alimentaire, le besoin des animaux, les performances de reproduction et de production sont peu connues chez ces animaux. De telles données permettront de mieux affiner les modèles et les recommandations pour ces animaux. Au total, 90 chevrettes nées cet hiver (février 2017) seront utilisées dans cet essai et pour étudier les interactions entre l'âge au sevrage et le niveau d'alimentation pendant la croissance. Trois traitements alimentaires, formulés à partir des recommandations des instituts techniques, seront testés. Les mesures réalisées concernent les performances de croissance (poids et taille), de production (quantité et qualité du lait), le développement de la glande mammaire, ainsi que les performances de reproduction (suivi des chaleurs). Nous suivrons la règle des 3R : Réduire : 90 animaux sont nécessaires pour disposer d'un nombre suffisant d'animaux par traitement expérimental à la fin de la première lactation. Il est important de tenir compte des pertes possibles (non reproduction, morts d'animaux, croissance insuffisante, accidents...). Raffiner : toutes les mesures seront réalisées par du personnel formé et expérimenté. Les animaux bénéficieront d'un suivi très proche par les animaliers, ainsi que par les différents intervenants, surtout entre la mise-bas et 1 mois après le sevrage. Remplacer : il n'existe

actuellement aucun autre modèle pour étudier la croissance chez cette espèce donc ce modèle chevrette est incontournable.

7502 La thématique globale du présent projet porte sur la compréhension des mécanismes physio(patho)logiques impliquant le récepteur nucléaire FXR dans l'homéostasie énergétique. Le récepteur nucléaire FXR est un facteur de transcription agissant tel un senseur métabolique permettant à l'organisme de s'adapter aux changements environnementaux en contrôlant l'expression de gènes impliqués dans l'homéostasie énergétique et le métabolisme glucidique, lipidique ou des acides biliaires. Il est d'ailleurs exprimé dans les tissus importants d'un point de vue métabolique (foie, tissu adipeux, muscle, pancréas, cerveau, intestin) et des anomalies dans la fonction de ce récepteur sont à l'origine de perturbations métaboliques. L'homéostasie énergétique, résultant d'une balance entre la prise alimentaire et la dépense énergétique, est régulée par le système nerveux central et par les organes périphériques (foie, tissu adipeux, pancréas, intestin, muscle), nécessitant par ailleurs une étroite communication entre ces différents organes. Aussi, l'objectif global du projet est d'étudier plus avant le rôle du récepteur nucléaire FXR dans la régulation de l'homéostasie énergétique en périphérie et au sein du cerveau ainsi que son implication dans la communication inter-organes, par des approches cellulaires (cultures primaires, cultures cellulaires) et intégratives (phénotypage métabolique, histologie, comportement, biochimie, méthodes moléculaires). Ce projet nécessite donc des approches intégrées utilisant des modèles murins d'invalidation tissu spécifique et des approches cellulaires utilisant des cultures primaires (de cellules de foie, d'adipocytes ou de cellules neurales). Ces expériences corrélant des approches moléculaires et métaboliques doivent se faire dans des modèles appropriés *in vivo*. Le nombre total d'animaux concernant les procédures de notre projet sur les 5 ans à venir est estimé à 9970. Notre projet répond aux exigences des 3R à savoir remplacement, réduction et raffinement. En effet, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être. Dans le cas de traitements pharmacologiques, seuls les composés ayant démontré leur innocuité seront utilisés. Particulièrement, nous serons attentifs aux paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

- perte de poids de 15% ou plus (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :
- apparence physique externe (pilo-érection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.)
- changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)
- réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés après anesthésie par kétamine/xylazine, euthanasies réalisées dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

7503 Les infections fongiques invasives sont des infections opportunistes, les levures et les champignons filamenteux sont les deux principaux types de champignons rencontrés en pathologie humaine. Les genres *Candida* et *Aspergillus* représentent la majorité des agents isolés chez l'humain.

Parmi le genre *Candida*, plus de 50% des infections sont dû à l'espèce *Candida albicans*. Cette espèce fait partie de la flore commensale chez l'homme sain, elle se retrouve au niveau de la peau, du vagin, du tractus ano-rectal, de la cavité buccale, de l'estomac, du duodénum, du jéjunum et de l'iléon. En milieu hospitalier, 17% des infections nosocomiales sont dues à une candidose invasive et *Candida albicans* représente la majeure partie des infections nosocomiales d'origine mycosique. Dans ces cas, ce sont généralement des infections profondes, encore appelées systémiques, dont le point de départ est souvent une dissémination hémotogène.

Les infections fongiques invasives sont en augmentation depuis plusieurs années. Cette augmentation s'explique par l'accroissement du nombre de patients souffrant d'immunodépression (hémopathie, cancer, infection HIV, transplantation,.) et les limites des thérapies antifongiques existantes (toxicité / effet secondaire et apparition de résistances aux antifongiques existants).

Malgré une meilleure prise en charge des candidoses systémiques, ces infections sont responsables d'une importante morbidité/mortalité dû à la fois à une difficulté de diagnostic et des thérapies

antifongiques limitées. Il est donc important de développer de nouveaux antifongiques agissant sur différentes cibles.

Ce projet va donc consister au développement d'un modèle murin d'infection fongique systémique à *Candida albicans* dans le but d'évaluer l'efficacité de traitements antifongiques sur ce modèle. Ce modèle permettra de mimer une infection de type profonde retrouvés chez certains patients hospitalisés.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser une infection fongique systémique. En effet, l'objectif étant de visualiser les différents foyers infectieux pouvant se développer dans un organisme entier après une infection par voie intraveineuse, le modèle animal reste dans ce cas irremplaçable.

Le modèle d'infection fongique systémique sera réalisé sur l'espèce souris car c'est un modèle animal standard polyvalent et son utilisation pour le modèle de candidose systémique est largement décrite dans la littérature.

Lors de la réalisation de ce modèle, les animaux seront observés et pesés trois fois par jour durant les 3 premiers jours suivant l'infection puis eux fois par jour durant les 3 premiers jours post-infection afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate.

Deux phases sont prévues dans ce projet. Tout d'abord, la réalisation et la validation de la mise en place du modèle de candidose systémique chez la souris puis dans un second temps l'évaluation de l'efficacité de traitement antifongique.

Pour la première étape, 100 souris maximum seront nécessaires pour mettre en place le modèle (détermination de la dose de *C. albicans* à administrer). Une première étude d'environ 50 souris sera donc réalisée qui pourra être suivi si nécessaire d'une seconde étude d'environ 50 souris pour permettre d'affiner le choix de la dose.

Pour la seconde étape, un maximum de 220 souris sera nécessaire pour évaluer l'efficacité de différents traitements antifongiques. Lors des deux étapes, les souris seront suivies au maximum pendant 14 jours.

Le recours à l'imagerie médicale (tomographe optique) permettra de suivre au cours du temps et de quantifier l'infection (quantification du signal de bioluminescence émis par les levures). De ce fait, l'imagerie de bioluminescence permet de suivre de façon temporelle et spatiale l'infection dans chaque individu. Le recours à cette méthode permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car tous les animaux sont conservés tout au long de l'étude. De plus, c'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen.

7504 L'impact de l'environnement nutritionnel maternel (obésité/diabète) sur le développement futur des désordres métaboliques chez la descendance est aujourd'hui bien connu, mais depuis peu certaines études montrent que l'environnement nutritionnel paternel, au moment de la conception, joue également un rôle non négligeable sur la descendance.

Au cours de ces dernières décennies les régimes hyperprotéinés ont été largement utilisés comme méthodes de perte de poids ou de construction de la masse musculaire. L'introduction de ces nouvelles pratiques alimentaires, peuvent avoir des conséquences sur le fonctionnement de certains organes chez l'individu. De plus l'on sait qu'un nombre important d'individus utilisant ce type de régimes / compléments alimentaires, est en âge de procréation.

Aussi le but de notre projet sera d'évaluer l'impact d'une alimentation hyperprotéinée, sur le développement du pancréas endocrine et sur les paramètres qui régulent la glycémie, chez la descendance de rats mâles ou femelles soumis à ce régime en période pré-conceptionnelle.

Des rats mâles et femelles seront nourris avec un régime riche en protéine (RHP) pendant 2 mois, puis seront accouplés respectivement avec des rats femelles ou mâles nourris avec un régime standard (RS).

Des rats mâles et femelles nourris pendant 2 mois avec un régime standard (RS) seront accouplés entre eux et constitueront le groupe contrôle de cette étude.

Nous étudierons chez la descendance, aux stades embryonnaires E13 jpc et E 18 jpc, le développement du pancréas endocrine et à l'âge adulte de 12 semaines, les paramètres de régulation de la glycémie ainsi que le risque de développement d'un diabète.

Cette étude permettra d'élargir les connaissances des mécanismes par lesquels les contraintes environnementales imposées aux parents, induisent des modifications permanentes du phénotype chez la descendance.

Pour ce projet il n'existe pas de méthode de remplacement à celle faisant appel aux modèles animaux. Ils sont les seuls à nous permettre d'appréhender les paramètres structurels et métaboliques du pancréas, ainsi que les taux hormonaux circulants. Dans ce sens le rat Wistar utilisé dans cette étude est un bon modèle car il présente de grandes similitudes dans sa physiologie et physiopathologie avec celle de l'Homme.

Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3R en utilisant un minimum d'animaux. Nous mettrons en place des conditions d'élevage (enrichissement de l'environnement) et de tests (raffinement des procédures) respectueux du bien-être animal.

Il n'est pas possible par des tests in vitro d'analyser d'éventuelles modifications métaboliques et fonctionnelles du pancréas endocrine. Seuls des tests in vivo permettent d'obtenir ce type d'informations. Les animaux sont donc des modèles incontournables. Le rat Wistar présente de fortes similitudes dans ses aspects physiologiques et physiopathologiques avec l'Homme, il reste donc un bon modèle pour notre étude.

Pour les tests IPGTT et IPITT, les animaux sont préparés à la contention, par les expérimentateurs, pendant la semaine qui précède. Ils recevront une injection intrapéritonéale de glucose et une semaine après une injection intrapéritonéale d'insuline (douleur du niveau d'une pique d'aiguille). Il n'y a pas de douleur durant le prélèvement à la queue de l'animal.

Au cours de cette étude qui durera 5 ans, nous utiliserons 584 animaux.

7505 D'après les estimations, 350 à 400 millions de personnes souffrent d'hépatite B chronique à travers le monde et 600000 décès sont causés par la maladie chaque année. Aujourd'hui, l'hépatite B reste incurable dans la plupart des cas et est responsable d'un nombre important de cirrhoses et de cancers du foie. Les traitements standards actuels, des traitements antiviraux, ne permettent pas aux patients de stabiliser leur maladie. Le taux de guérison, de 3 à 25% selon la population de patients, reste insatisfaisant. De plus, certaines populations présentent des réponses moins bonnes aux traitements (efficacité moindre).

Le projet a pour but de mettre au point des produits d'immunothérapie innovants pour le traitement de l'hépatite B, notamment chez des patients répondant moins bien aux traitements, ainsi que des dispositifs d'injection permettant une réponse immunitaire optimale.

Les produits développés ont pour but d'induire une réponse immunitaire semblable à celle que l'on observe chez les patients qui guérissent spontanément.

Aucun modèle de substitution aux animaux n'est disponible pour répondre aux objectifs du projet, nécessitant un système immunitaire fonctionnel et l'étude du devenir des produits après injection (diffusion de la peau au sang, par exemple).

Notre travail consiste à mesurer l'immunité induite chez l'animal par le produit après injection. Cette immunisation est suivie par des prélèvements sanguin réguliers, de volume réduit. Si les résultats sont concluants, des essais évalueront l'efficacité des différents traitements ce qui nous amènera à induire, chez certains animaux, une hépatite B chronique qui peut provoquer des effets cliniques tels que de la perte de poids. Tout signe clinique anormal, qui pourrait être dû à une intolérance aux produits ou à l'effet de l'induction de l'hépatite B, sera pris en charge par les vétérinaires de notre institution.

Le projet nécessitera l'utilisation de 465 cobayes et/ou 930 souris au maximum sur 5 ans, pour l'évaluation de plusieurs produits. Ce nombre, est, d'après nos calculs statistiques préliminaires, le

minimum pour obtenir des résultats scientifiquement exploitables. Il pourra être réduit en fonction des résultats obtenus, et du nombre de produits réellement évalués. Le projet pourrait en effet être arrêté prématurément si un produit donne rapidement des résultats satisfaisants, et passera dans une autre phase, en vue de la mise sur le marché et la mise à disposition des patients atteints d'hépatite B.

Le projet porte sur des produits d'immunothérapie, leurs interactions avec l'immunité déjà acquise, les voies d'injection à utiliser afin d'optimiser leur efficacité, et enfin l'évaluation de leur efficacité dans un modèle infecté. Par conséquent, il n'est pas possible de s'affranchir d'un organisme vivant avec un système immunitaire pleinement fonctionnel. Aucune méthode de substitution ne permet de mimer les mécanismes complexes du système immunitaire et les interactions avec différents pathogènes.

Chez le cobaye, les procédures mises en œuvre ne sont pas douloureuses car réalisées par une personne qualifiée : il s'agit uniquement d'injections sous-cutanées et intradermiques, et d'administrations intranasales. Afin de limiter le stress des animaux et d'assurer la répétabilité et la précision des administrations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie légère (réveil rapide afin de ne pas impacter la santé de l'animal de façon notable). De la même façon, les prélèvements sanguins ne seront réalisés que sous anesthésie. Chez les souris avec AAV-HBV, les mêmes points limites sont respectés.

Durant le projet, les animaux seront hébergés selon les besoins de leur espèce, en groupe avec des éléments d'enrichissement du milieu (cachette, foin, blocs à ronger.). Ces études sont menées par du personnel spécialement formé aux soins et à l'observation des signes cliniques chez les rongeurs de laboratoire.

7506 Les états septiques qui associent une infection bactérienne ou fongique et une réponse inflammatoire systémique, demeurent un réel problème de santé publique car ils représentent la première cause de mortalité en service de réanimation et l'une des premières causes de mortalité intra-hospitalière après les pathologies cardio-vasculaires et les cancers. Depuis 20 ans, leur mortalité est restée constante (de 40 à 60 % pour le choc septique) en dépit des nombreux essais cliniques visant à corriger les désordres inflammatoires. De façon plus préoccupante, l'incidence des états septiques est en constante augmentation (probablement du fait de l'augmentation de la durée de vie et de la meilleure prise en charge des comorbidités : cancer, diabète...). Ainsi, les projections américaines établissent que le seuil du million de cas annuels sera franchi aux USA avant l'année 2020.

Le traitement actuel vise à détruire les bactéries et à lutter contre les désordres inflammatoires et immunitaires. La dialyse, un traitement de purification du sang couramment utilisé en France chez les insuffisants rénaux pourrait permettre d'atteindre ces objectifs thérapeutiques. Cette méthode de soins consiste à faire circuler le sang du patient via une circulation extracorporelle dans un rein artificiel pour l'épurer. La dialyse permet non seulement d'éliminer du sang des produits du métabolisme dans un contexte d'insuffisance rénale mais également de soustraire des toxines et médiateurs de l'inflammation. Elle pourrait donc être utilisée dans le choc septique afin d'éliminer soit la cause du sepsis (les bactéries responsables de l'infection initiale) soit ses conséquences à savoir la production de facteurs pro et anti-inflammatoires à l'origine de la défaillance d'organe et/ou de l'immunosuppression. L'objectif de l'étude proposée est de comparer les effets de différentes membranes de dialyse dans le traitement des patients septiques. Des essais préliminaires ont été réalisés *in vitro* mais seul le recours à un modèle préclinique permettra d'évaluer les effets de ce type de traitement sur les conséquences du choc septique (conséquences hémodynamiques et inflammatoires).

Le modèle porcin septique présente des similitudes avec la pathologie humaine. Les phénomènes physiologiques du choc sont très bien décrits dans la littérature. Les animaux qui suivent des séances de dialyse sont maintenus sous anesthésie générale, et pris en charge tels des patients humains en service de réanimation (hydratation, prise en charge de la douleur). Cette étude devrait permettre d'améliorer la prise en charge des patients septiques en service de réanimation et de diminuer la mortalité.

Notre projet utilisera un maximum de 22 porcs. Après une première étude exploratoire avec des animaux qui ne seront pas réveillés au cours de l'essai d'épuration extra-rénale, nous commencerons progressivement à travailler avec des animaux qui seront réveillés au cours du choc septique, avec des méthodes de réanimation similaires à celles qui seront utilisées chez l'Homme. Ces animaux

pourraient éprouver les douleurs et souffrances physiologiques inhérentes à l'état de choc septique. Tous les moyens médicaux seront mis en œuvre pour limiter la douleur, l'hyperthermie, et les défaillances physiologiques. En cas de souffrance importante, l'animal sera euthanasié. La totalité du projet sera menée par une équipe mixte de personnes qui connaissent très bien le porc et d'anesthésiste/réanimateurs travaillant dans des hôpitaux. En fonction des résultats, le nombre d'animaux sera limité au strict nécessaire pour obtenir des résultats utilisables chez l'Homme, avec un maximum de 22.

7507 L'objectif de ce projet est de mettre en évidence l'effet anti-tumoral de l'association de chimiothérapies de référence dans les cancers du sein (DOX et DXT) avec un médicament couramment utilisé en cardiologie (la Trinitrine) et une immunothérapie (Anti-PD1). Le but est de montrer que les chimiothérapies et la Trinitrine induisent des modifications génétiques et immunitaires dans les tumeurs et rendent ainsi efficace le traitement par l'immunothérapie. L'intérêt de ce travail est grand puisqu'il devrait conduire à développer de nouvelles combinaisons thérapeutiques efficaces chez les patientes porteuses de cancers du sein très agressifs tels que les sous-types triple négatif (TN) et HER2+, chez qui les traitements actuels restent peu efficaces.

Nous analyserons les modifications induites par les chimiothérapies et/ou la Trinitrine au niveau génétique et immunitaire sur des tumeurs mammaires TN ou HER2+, et corrélons l'implication de ces modifications à l'efficacité de réponse anti-tumorale d'un anti-PD1. Ces expériences, ne peuvent pas être réalisées *in vitro* ou à partir de méthodes alternatives puisque ce traitement nécessite la présence d'un système immunitaire compétent, d'où l'utilisation de souris immunocompétentes.

Ce projet qui va durer 5 ans nécessite l'utilisation de 342 souris Balb/C (modèle TN) et 342 souris C57Bl/6 (modèle HER2+) réparties comme suit :

(1) l'étude des modifications génétiques et immunitaires des tumeurs nécessite 162 souris par modèle de souris, qui seront réparties en groupes de 3 souris par condition de traitements (6 conditions) et par temps de prélèvement (3 temps). Ces expériences devront être réalisées trois fois pour l'obtention de résultats statistiquement fiables (Mann-Whitney).

(2) l'étude de l'efficacité anti-tumorale de l'association des chimiothérapies, de la Trinitrine et de l'anti-PD1 nécessite l'utilisation de 180 souris Balb/c (modèle TN) et 180 souris C57Bl/6 (modèle HER2+) qui seront réparties en 12 groupes (différentes combinaisons de traitements) de 5 souris. Pour obtenir des résultats robustes et statistiquement significatifs ces expériences devront être réalisées trois fois, comme nous l'ont démontrées des études précédentes.

L'hébergement des souris se fera en groupe pour éviter le stress. Du matériel d'enrichissement permettant la construction de nid sera fourni quand nécessaire et le calme sera maintenu tant que possible dans la salle d'hébergement. Les lignées de cellules tumorales murines mammaires TN et HER2+ seront injectées dans le flan de souris anesthésiées, par voie sous-cutanée. Les différents traitements seront administrés par voie intrapéritonéale ou intraveineuse. Les animaux seront suivis tous les 2-3 jours pour vérifier leur bien-être et déterminer la progression tumorale par mesure du volume de la tumeur. En cas d'apparition de nécrose les tumeurs seront traitées avec une crème cicatrisante, si la nécrose dépasse 2 mm de diamètre ou si la taille de la tumeur dépasse 1500 mm³ ou si d'autres signes de souffrance apparaissent, les animaux seront euthanasiés.

7508 Les antibiotiques ont révolutionné la prise en charge des infections bactériennes. Toutefois, l'augmentation de leur consommation a été de concert avec l'expansion des résistances bactériennes et présage à des impasses thérapeutiques imminentes. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) s'alertait en Octobre 2016 de la grave menace de « l'ère post-antibiotique », et la nécessité absolue de trouver des alternatives thérapeutiques.

On note par exemple que la proportion de souches résistantes aux céphalosporines de 3ème génération parmi les souches responsables de bactériémies à *Klebsiella pneumoniae* est devenue préoccupante. En effet celle-ci est passée de 4 % en 2005 à 31 % en 2015 et cette résistance est majoritairement attribuable à la production de bêta lactamase à spectre étendu (BLSE).

Le microbiote intestinal est un important réservoir de gènes de résistance aux antibiotiques. Cependant, son implication dans l'acquisition et la persistance de résistances n'est pas clairement

élucidé. Dans un modèle murin de portage digestif d'*Enterococcus* résistant à la Vancomycine (ERV), une équipe a rapporté qu'il était possible d'éradiquer le portage d'ERV par une transplantation fécale. Des stratégies de modulations du microbiote intestinal sont en cours d'évaluation par transplantation fécale mais son efficacité reste toujours très controversée et sa spécificité d'action interroge.

Dans ce contexte, la phagothérapie permettrait une éradication ciblée d'un pathogène, mais aussi une modulation fine du microbiome, susceptible de révéler une efficacité maximisée (avec un impact minime sur l'équilibre symbiotique de l'hôte). Des études pilotes sont en cours mais les données restent lacunaires. Sa spécificité d'action et son impact sur les microbiomes doivent être précisés, à l'instar des voies d'abord, vecteurs et/ou formes galéniques à privilégier selon le site d'action cible.

La phagothérapie présente de nombreux avantages sur les thérapies antibiotiques traditionnelles : la cinétique d'acquisition des résistances est 10 fois plus lentes que l'antibiorésistance, leur infectiosité est forte et préservée même en conditions environnementales extrêmes et leur sécurité et tolérance sont enfin relativement intuitives en regard de leur incapacité à infecter les cellules eucaryotes. Mais malgré sa relative spécificité, de hautes concentrations de phages sont susceptibles de moduler l'empreinte microbienne. A ce stade la phagothérapie semble donc constituer une alternative enthousiasmante pour aborder l'ère post-antibiotique tant redoutée par les autorités de santé, mais requiert davantage de recherches tant sur le plan mécanistique que clinique. Notre objectif de travail est de tester l'efficacité de l'éradication d'entérobactéries productrices de BLSE au sein du tractus digestif dans un modèle murin. Le but étant de limiter la propagation de ces bactéries résistantes en limitant les effets sur le microbiote digestif de l'hôte. Pour cela nous utiliserons 191 souris C57BL/6 mâles de 6 semaines de vie. Cette étude sera menée en appliquant la règle des 3R. Remplacer : les techniques in vitro ne permettent pas d'obtenir des données fiables sur l'activité in vivo d'une molécule et sur le potentiel de sélection d'une souche bactérienne résistante. La corrélation in vitro - in vivo n'étant pas satisfaisante, et l'étude chez l'Homme non réalisable, le recours à l'utilisation de modèles animaux est donc indispensable. Réduire au maximum le nombre de souris, Raffiner en mettant en place des points limites et Remplacer au maximum l'utilisation des animaux. Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Enfin le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude.

7509 Les ovins et les caprins sont régulièrement utilisés pour la recherche biomédicale dans le domaine de la santé animale. Ils sont notamment inclus dans des études de pharmacocinétique dont le but est de suivre la concentration d'un produit d'intérêt médical dans le sang au cours du temps.

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

L'enjeu de ce projet est donc la réalisation des études de pharmacocinétique chez les ovins et caprins, en administrant aux animaux un traitement à tester et en pratiquant ensuite des prélèvements sanguins, soit par ponction directe, soit en utilisant un cathéter intraveineux par lequel on peut aspirer du sang.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement de reproduire la diffusion d'un produit dans le sang des animaux, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier un produit.

Au maximum pour ce projet, nous prévoyons de réaliser la phase animale des études pharmacocinétiques de 60 produits au maximum, en 5 ans.

Chaque produit à tester fera l'objet d'une étude particulière. On calculera pour chaque étude le nombre d'animaux nécessaire, il sera toujours réduit au minimum, en tenant compte de la variabilité des résultats attendus. Par ailleurs des études préliminaires aux études de pharmacocinétiques pourront permettre des mises au point de la technique de pose des cathéters, de manière à l'adapter aux études ultérieures.

Au total, au maximum 800 animaux pourront être utilisés en 5 ans dans ce projet. Le mode d'administration des produits sera fonction du produit à tester mais toujours conforme aux recommandations en vigueur et aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les prélèvements sanguins seront toujours réduits au minimum. Ils pourront être réalisés par une prise de sang, avec une aiguille, de la veine jugulaire.

Cependant, il sera possible pour éviter de trop multiplier les ponctions source de stress et de douleur de poser un cathéter intraveineux par lequel on pourra aspirer du sang et qui restera à demeure pendant toute la période des prélèvements sanguins.

L'hébergement individuel pourra dans ce cas être requis afin d'éviter que les animaux ne s'arrachent leurs cathéters, une attention particulière sera alors portée au raffinement et à l'enrichissement du milieu pour éviter l'ennui : contact visuel et olfactif entre congénères, surface suffisante de l'hébergement.

Des animaux naïfs et non naïfs pourront participer à ce projet.

7510 Notre étude s'intéresse à une maladie neurologique rare qui est caractérisée par une dégénérescence des neurones du cervelet. Les symptômes associés sont des troubles de l'équilibre et de la coordination conduisant à un handicap sévère en quelques mois. Elle touche principalement des femmes atteintes d'un cancer gynécologique (ovaire, sein). Chez ces patientes, le système immunitaire normalement responsable de détruire la tumeur, s'attaque également aux neurones du cervelet et les détruit. Le diagnostic est confirmé par la détection d'anticorps présents dans le sang et dans le cerveau dont la caractéristique est de reconnaître les neurones du cervelet.

Au laboratoire nous avons identifié 2 protéines ciblées par le système immunitaire. Ces 2 protéines sont normalement présentes chez l'homme dans les neurones du cervelet. Or chez les patientes elles sont également présentes dans la tumeur et semblent responsables de l'activation du système immunitaire dans l'environnement de la tumeur. Par des mécanismes encore mal compris, le système immunitaire va également s'activer dans le cerveau et détruire les neurones du cervelet. Afin d'étudier les mécanismes à l'origine de la pathologie, le recours à un modèle animal est indispensable à cause de la rareté des échantillons de patientes et permettra des analyses plus approfondies depuis l'apparition de la tumeur jusqu'à la destruction des neurones. L'objectif principal de ce protocole expérimental est donc de développer un modèle de la maladie chez la souris qui soit au plus proche de la maladie humaine.

Pour développer notre modèle, nous provoquerons le développement d'un cancer ovarien chez la souris par l'implantation de cellules tumorales dans la cavité abdominale des souris. Nous stimulerons ensuite la réponse immunitaire par une vaccination avec nos protéines d'intérêt et avec un traitement qui favorisera la réponse immunitaire dans le cerveau. La destruction des neurones du cervelet des souris sera évaluée par des tests de coordination et de motricité, et par des analyses sur coupe de cerveau. Une analyse en fin de protocole du sang, des tumeurs et du cerveau permettra d'identifier la présence d'anticorps spécifiques, et de caractériser la réponse immunitaire. Notre protocole expérimental permettra également d'étudier le rôle de nos protéines d'intérêt dans le développement de la maladie en fonction de leur représentation dans la tumeur.

La règle des 3R sera appliquée conformément à la directive Européenne : (I) Des études réalisées au laboratoire à partir du sang des patientes ont permis d'identifier les protéines ciblées dans les neurones du cervelet. Ces mêmes protéines ont été identifiées dans les tumeurs. Un modèle de la maladie chez la souris est désormais indispensable pour valider nos hypothèses sur les mécanismes qui conduisent à la destruction des neurones du cervelet. Aucune méthode alternative ne permet de satisfaire l'objectif de Remplacement à notre connaissance (II) Dans un souci de raffinement de notre procédure expérimentale nous avons mis en place une phase pilote d'évaluation du modèle de cancer ovarien chez la souris. Le recours à ce modèle implique une connaissance précise de l'évolution de la tumeur et de son impact sur le bien-être de nos souris pour pouvoir anticiper sur la nécessité d'un antidouleur. Une grille d'évaluation de la souffrance et de la détresse de l'animal a été mise en place lors de cette phase pour anticiper au mieux les points limites. Nous allons placer notre procédure expérimentale pendant la phase asymptomatique du cancer ovarien pour éviter toute interférence de la progression du cancer avec l'évaluation des troubles locomoteurs. Du fait de la courte durée de la procédure (12 semaines maximum), les symptômes attendus seront faibles et n'impacteront pas de manière significative sur le bien-être animal. (III) Le projet sera découpé en plusieurs phases afin de hiérarchiser les expérimentations et réduire le nombre d'animaux. Nous réaliserons à chaque étape une première série d'expérimentations sur la moitié de l'effectif prévu. Un test statistique permettra de déterminer l'effectif supplémentaire éventuellement nécessaire pour consolider les résultats. Nous

compléterons alors au maximum jusqu'à l'effectif prévu initialement soit au maximum 292 animaux au total.

Nous limiterons également le nombre d'animaux au maximum en réalisant les tests de comportement et les différentes analyses sur les animaux d'un même lot.

Grâce à ce modèle de la maladie, l'identification des mécanismes qui conduisent à l'activation des défenses immunitaires contre les neurones du cervelet des patientes permettra à terme de développer une thérapie efficace pour guérir les femmes atteintes de cette maladie.

7511 A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodéveloppementales telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux troubles du développement du cerveau caractéristiques de ces pathologies, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliquée dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Le cerveau est composé d'un ensemble de circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les neurones acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Ces dernières années nous avons identifiés un gène candidat : le gène *Vangl2*. Ces gènes sont exprimés dans le cerveau des mammifères et nous soumettons ici l'hypothèse que *Vangl2* contrôle le développement des circuits de neurones au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au bon fonctionnement du cerveau.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Raffiner : Pour supprimer l'anxiété, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Réduire : Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 8 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous utiliserons dans ce projet deux lignées de souris transgéniques dont une à quatre stades de développement. Notre projet portera donc sur 20 lots de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 160 souris sur 5 ans.

7512 La transplantation d'îlots aujourd'hui est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 et utilise le foie comme organe receveur de la greffe. En revanche, cette thérapeutique est proposée aux patients avec un diabète instable présentant des fluctuations glycémiques importantes. Ce fort déséquilibre glycémique est associé à l'activation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) à l'origine de l'apparition de stress oxydant chez les patients diabétiques de type 1. Le stress oxydant joue un rôle majeur dans la physiopathologie du diabète et de ses complications. Peu d'études s'intéressent aujourd'hui au rôle du stress oxydant hépatique dans la perte de fonctionnalité des îlots post-greffe. Une étude antérieure au laboratoire nous a permis de caractériser le stress oxydant hépatique chez le rat diabétique de type 1 et de mettre en évidence l'implication majeure d'une enzyme pro-oxydante. Une seconde étude nous a permis de montrer que le stress oxydant dans le foie est diminué par une administration d'apocynine en biberon chez les rats diabétiques. La présente étude se focalisera donc sur le potentiel effet bénéfique de ce traitement sur la réussite à court mais aussi à long terme de la greffe d'îlots. Nous avons choisi le modèle du rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Cette étude sera réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, greffés avec des îlots pancréatiques pour mimer le contexte clinique chez le patient humain. Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (220 rats mâles Lewis). Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des

conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Enfin, L'étude consiste à déterminer l'efficacité de l'apocynine sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique. Ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

7513 La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Le diabète de type 1 est une maladie auto-immune générant la destruction des cellules bêta à insuline et provoquant une glycémie à jeun $>1.26\text{g/l}$ de sucre par litre sang. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. De plus l'implantation a lieu dans les veines du foie ce qui génère une réaction inflammatoire intense qui va détruire jusqu'à 40% de la greffe. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, la transplantation d'îlots chez le rat est un outil d'intérêt. Cependant la réversion du diabète chez le petit animal utilise énormément d'animaux.

Le but de l'étude est donc de réduire le nombre d'îlots à transplanter afin de limiter le nombre de rats utilisés pour nos études. Il s'agira de greffer un nombre nécessaire d'îlots pour pouvoir observer des effets métaboliques de traitements mais minimal n'induisant pas de réversion du diabète. Nous souhaitons donc mener une étude sur des quantités croissantes d'îlots transplantés et d'étudier les marqueurs classiques pour détecter la fonction d'un greffon dans les différents sites de transplantation utilisé au laboratoire (rein, omentum, le muscle, en sous-cutanée et foie).

L'étude consiste à déterminer la quantité minimale mais suffisante d'îlots à transplanter afin de détecter une fonction du greffon chez un sujet diabétique en vue de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour les différents projets du laboratoire. Ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

Nous avons choisi le rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Pour chaque groupe expérimental 10 rats diabétiques seront utilisés afin d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques. Au total, 410 rats diabétiques seront utilisés, ce qui nécessite, au vu des 80% d'efficacité du modèle d'induction du diabète utilisé, l'emploi de 500 rats sains. Enfin, l'obtention d'îlots pancréatiques de rat pour l'étude nécessitera l'utilisation de 1100 rats sains, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 1600. Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire. Le principe de réduction est au cœur de cette étude puisque grâce à cette étude nous pourrions dans nos protocoles futurs réduire le nombre de rats donneurs.

7514 Domaine et objectifs du projet :

Les muqueuses buccales, digestives et vaginales sont en contact avec un milieu complexe dans lequel coexistent des cellules épithéliales et immunes de l'hôte et une grande diversité de microorganismes rassemblés sous le nom de « microbiote ». A côté de la portion bactérienne majoritaire du microbiote, il existe d'autres types de microorganismes et particulièrement des champignons. Parmi ces champignons certains peuvent être à l'origine d'infections superficielles, douloureuses, handicapantes et souvent récurrentes. Par leur ampleur et leur répétition, elles représentent un réel problème de santé publique pour une portion importante de la population des pays développés. Les infections buccales et vaginales sont parmi les affections les plus souvent rencontrées. Elles ont majoritairement pour origine la levure du genre *Candida*, on parle alors de candidose, et en particulier *Candida albicans*. Le rôle des bactéries dans le développement de ces infections n'a été que superficiellement documenté. Le rôle du microbiote fongique sur les infections fongiques, quant à lui, n'est pas encore étudié. D'autre part, toutes ces infections ont majoritairement

une source endogène avec le développement d'un champignon colonisant déjà les différentes niches (bouche, tractus digestif ou vagin). Les situations d'altération des populations bactériennes du microbiote, comme au cours d'une antibiothérapie, donnent lieu à une prolifération des populations fongiques pouvant induire des infections telles les candidoses. On sait qu'en cas d'immunosuppression associée à une rupture de la barrière intestinale, une dissémination à distance des champignons intestinaux peut se faire, donnant lieu à des infections fongiques profondes qui sont, elles, mortelles. Qu'elles soient superficielles ou profondes, ces pathologies sont devenues un véritable enjeu de santé publique puisqu'elles s'avèrent difficiles à diagnostiquer (le micro-organisme préexiste le plus souvent chez le patient) et aussi malaisées à traiter (peu de molécules actives disponibles pour les praticiens). Notre projet a pour objectif d'élargir les recherches sur le rôle des portions bactériennes et fongiques du microbiote lors d'infections fongiques superficielles afin d'anticiper et de minimiser le risque de dissémination systémique.

Avantages et dommages attendus :

Cette étude va permettre à travers des tests relativement peu invasifs d'identifier des cibles fongiques et/ou bactériennes bénéfiques ou néfastes lors d'infections fongiques superficielles. Des traitements antimicrobiens de même que l'apport de probiotiques bactérien ou fongique pourront être réalisés afin de réguler les infections, permettant ainsi le développement de nouveaux outils thérapeutiques.

Ces études s'appuieront sur des modèles d'infections superficielles déjà largement utilisés dans les laboratoires scientifiques mondiaux.

La complexité biologique de la question posée mettant en jeu à la fois les différents types cellulaires de l'hôte, la flore commensale et des facteurs génétiques rend indispensable l'utilisation d'animaux modèles. En parallèle d'expérimentation *in vitro*, nous avons besoin d'un modèle rassemblant l'ensemble des éléments de cet écosystème afin de rendre compte de tous les échanges moléculaires existant entre ces différents partenaires.

Nombre et type d'animaux utilisés :

Dans ce projet qui s'intéresse à l'interaction entre les différentes populations du microbiote et l'hôte dans un contexte infectieux aucune alternative *in vitro* (culture cellulaire ou culture d'organe) n'est malheureusement possible. Trop d'éléments interagissent dans un environnement très spécifique mettant en jeu des réactions complexes chez l'hôte que ce soit dans la sphère oropharyngée ou la sphère vaginale. Il est donc indispensable d'utiliser des animaux pour ce type de projet.

Pour ce projet nous utiliserons le modèle rongeur : des souris adultes sans modification génétique ou des souris génétiquement modifiées ayant des modifications de leurs voies de réponses du système immunitaire (souris Dectin1KO, Dectin2KO, Card9KO et Card9KO-conditionnelles chez qui il y a délétion de Card9 dans certaines populations cellulaires du système immunitaire uniquement et pas dans les autres cellules). Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Sur ce projet de 5 ans nous prévoyons d'avoir recours à un minimum nécessaire de 368 animaux par an soit un total de 1840 animaux. Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Nous avons également réduit au maximum le nombre de répétition et nous avons limité nos expérimentations à celles absolument indispensables.

Trois procédures expérimentales seront utilisées :

- Les procédures d'infections superficielles oropharyngée et vaginale sont des procédures modérées de 5 semaines maximum n'induisant qu'une gêne limitée à l'animal avec peu ou pas de perte de poids et aucune mortalité. L'infection initiale pour le modèle d'infection superficielle, ainsi que les prélèvements vaginaux lors du suivi de l'infection vaginale dans le temps nécessitent une anesthésie.
- La procédure de dissémination systémique couple une colonisation intestinale à une inflammation dans un contexte d'immunosuppression ce qui reprend au plus près les cas cliniques chez l'homme ayant subi de telles infections profondes. L'expérimentation ne dure que 2 semaines maximum. C'est une procédure sévère pouvant aboutir à la mort des animaux, qui ne sera mise en place qu'en fin de projet avec des probiotiques (micro-organismes ayant un effet bénéfique sur la santé) fongiques ou bactériens clairement définis afin de tester leur efficacité protectrice. Lors de cette procédure une

attention toute particulière sera portée à l'état de santé de l'animal qui sera euthanasié si les points limites sont atteints : poil hirsute, immobilité, baisse de poids de plus de 20%.

Nous avons veillé à enrichir le milieu de vie par l'ajout de feuille de cellulose dans les cages et d'un abri prévu à cet effet. Les animaux seront 6 par cage maximum. Le suivi attentif et quotidien des animaux sera réalisé afin de minimiser autant que possible la souffrance éventuelle des animaux.

7515 Nous formons des techniciens en biologie et leur proposons une formation des personnels amenés à appliquer des procédures expérimentales aux animaux (ex-niveau II). Ce type de formation réglementaire à l'expérimentation animale doit permettre l'acquisition de compétences théoriques et pratiques favorisant la manipulation d'animaux dans le respect de leur bien-être. Conformément à l'approbation de cette formation par le Ministère de l'Agriculture, il s'agira d'enseigner aux étudiants de bonnes pratiques pour la réalisation d'une anesthésie du rat et de la souris de laboratoire. L'anesthésie est un acte de sévérité légère pour l'animal. Les travaux pratiques que nous souhaitons réaliser permettent une familiarisation progressive des techniciens avec l'animal de laboratoire ; ils auront été formés au préalable aux actes de préhension, contention et injections. Ces TP d'anesthésie sont réalisés en effectif étudiant réduit, sous la tutelle d'enseignants et de techniciens expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal. Des enseignements plus théoriques d'éthique, d'éthologie, de physiologie nociceptive viennent compléter ces connaissances afin que les étudiants soient en mesure d'adapter leur pratique au comportement de l'animal qu'ils manipulent. Le choix des rongeurs s'explique par l'utilisation majoritaire de ces modèles animaux en expérimentation, les techniciens en formation étant essentiellement amenés à manipuler ces espèces dans leur entreprise. Nous formons jusqu'à 170 étudiants par an, chacun devant apprendre à manipuler un animal mais nous n'aurons recours qu'à l'utilisation maximale de 340 souris et de 340 rats sur cinq années de formation pour ces travaux pratiques. En effet, un même animal sera employé pour plusieurs séances, en respectant un délai de plusieurs jours entre deux anesthésies permettant pour une bonne récupération. Ceci permettra de restreindre les effectifs animaux employés. Dans cette même perspective, ces animaux seront issus d'un autre projet autorisé, de sévérité légère, et ne seront pas euthanasiés en fin de TP mais seront réutilisés pour d'autres travaux pratiques (impliquant une manipulation sous anesthésie sans réveil), ce qui va dans le sens d'une réduction du nombre d'animaux manipulés.

7516 La cachexie associée au cancer ou au sepsis (syndrome d'infection générale et grave de l'organisme par des germes pathogènes) est un syndrome regroupant plusieurs symptômes, caractérisé notamment par une perte de poids corporel dramatique. Celle-ci résulte principalement d'une perte de masse adipeuse et de masse musculaire, appelée cachexie. La cachexie liée au cancer et au sepsis réduit la qualité et la durée de vie des patients et peut diminuer l'efficacité des traitements. De plus, la fatigue induite par les traitements de chimiothérapie et l'incapacité à réaliser des contractions musculaires volontaires qui résulte de la sédation et/ou de la ventilation mécanique imposée au patient en soins intensifs exacerbent les dysfonctions musculaires. Ainsi, la possibilité d'augmenter l'activité musculaire par l'intermédiaire de stimulations électriques (ou électrostimulation neuromusculaire) appliquées à la surface de la peau pourrait être une stratégie efficace pour lutter contre ces atteintes musculaires.

La mise en évidence d'un bénéfice de l'électrostimulation musculaire (ESNM) sur ces pathologies graves nécessite le recours aux animaux (souris). L'objectif de ce projet de recherche fondamentale est : 1) d'évaluer si un entraînement par ESNM permet de limiter les effets délétères du syndrome cachectique associé au cancer et au sepsis sur le fonctionnement du muscle squelettique, et 2) le cas échéant d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires qui expliquent ce bénéfice. Le développement de nouvelles méthodes de reconditionnement physique est primordial afin d'augmenter l'activité musculaire chez ces patients sévèrement atrophiés et déconditionnés à l'effort. Si la compréhension des mécanismes sous-jacents sera en partie analysée via l'utilisation de cultures cellulaires, l'étude du bénéfice de l'ESNM ne peut être réalisée qu'*in vivo*, en conditions physiopathologiques *in vivo*, et ce à l'aide des modèles adéquats.

Ce projet est divisé en 4 procédures et mobilisera 1446 souris, y compris les individus reproducteurs.

Les démarches mises en œuvre pour suivre les 3R sont :

Remplacement : d'une part, la possibilité de travailler chez la souris, soit sur des modèles transgéniques (i.e., ApcMin/+) soit sur des modèles expérimentaux de cancer et de sepsis, permet d'identifier le rôle de cellules particulières ou de molécules dans les processus biologiques étudiés. D'autre part, les études de physiologie nécessitent l'utilisation de modèles animaux car seule l'analyse du tissu, voire de l'organisme entier permet d'identifier le réel impact de ces interactions moléculaires et cellulaires sur la fonction de l'organe. De plus, l'approche *in vivo* permet d'étudier des approches thérapeutiques *in toto*, dans un contexte préclinique.

- Réduction du nombre d'animaux : le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum après analyses statistiques des expériences passées de l'équipe et des données de la littérature. Les tissus musculaires des animaux sont prélevés et conservés dans une banque biologique constituée dans le laboratoire, permettant de réutiliser les tissus pour des analyses ultérieures sans recours à des animaux supplémentaires. Les accouplements sont optimisés afin de produire le nombre nécessaire de souris. Le dispositif expérimental d'électrostimulation est non invasif et permet ainsi un suivi longitudinal des animaux, permettant de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés.

- Réduction de la douleur, souffrance, raffinement : les protocoles les moins invasifs et les moins douloureux possibles sont privilégiés. Des anesthésiques et des analgésiques sont utilisés pendant et au décours des expérimentations afin de réduire au maximum le stress et la souffrance des animaux. Des mesures sont prises pour améliorer les conditions d'élevage afin d'enrichir l'environnement des souris. Aussi, le suivi de critères précis permet de mettre à mort rapidement les animaux présentant un phénotype dommageable. Ainsi, une grille de score permet d'éviter toute souffrance inutile et de prendre les mesures adéquates selon l'évolution du tableau clinique de chaque animal.

7517 Le SAPL est une maladie auto-immune et de la coagulation, caractérisée des phénomènes thrombotiques veineux ou artériels et de troubles obstétricaux (fausses couches, pertes fœtales, pré-éclampsie), associés à la présence des anticorps anti-phospholipides. Il a été démontré que les anticorps anti-phospholipides engendrent une dysfonction potentiellement responsable de ces manifestations cliniques mais également d'une athérosclérose précoce.

Le traitement actuellement reconnu du SAPL est un traitement symptomatique basé sur l'anticoagulation, qui nécessite une surveillance régulière des ratios de coagulation et qui entraîne une limitation des activités des patients, souvent jeunes, du fait d'un risque d'hémorragie pouvant engendrer le pronostic vital. Nous pensons que des traitements immunomodulateurs, des vitamines (vitamine D), immunosuppresseurs et anti-inflammatoires, bien connus, pourraient corriger la dysfonction endothéliale en agissant directement sur des mécanismes intimes du SAPL et ainsi constitueraient un traitement plus ciblé, alternative aux lourds traitements actuels.

Notre hypothèse est que les anticorps antiphospholipides pourrait aussi avoir un rôle dans la formation de plaque d'athérome, notamment au niveau du stress oxydatif (moment où les LDL sont oxydés et ne peuvent plus être reconnus par leurs récepteurs spécifiques, mais par les récepteurs "éboueurs" des macrophages). En rajoutant des traitements aux traitements spécifiques, nous pourrions alors également étudier si ces médicaments ont un rôle protecteur dans la formation des plaques athéromateuses.

L'objectif de cette étude est d'analyser la relaxation de l'endothélium dans un modèle murin de syndrome des antiphospholipides (SAPL) sous l'action de traitements immunosuppresseurs et anti-inflammatoires (hydroxychloroquine, vitamine D, statines, prednisone, cyclophosphamide, azathioprine) et démontrer que ces molécules restaurent la fonction endothéliale.

Un lot de 252 Souris de deux sexes sera nécessaire pour cette étude. Une partie de ces souris sera utilisée en premier lieu pour des études préliminaires afin d'évaluer le rôle protecteur des médicaments, puis dans un second temps, nous rechercherons grâce à des prélèvements les mécanismes intervenant dans cette protection.

Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer autant que possible une Réduction des animaux utilisés le Raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie ainsi que le Remplacement le cas échéant par des techniques *in vitro*. En accord avec la règle des 3 R, et dans le but d'obtenir des résultats significatifs, nous utiliserons le moins de souris possible. De

plus, le régime alimentaire des souris n'induit aucune douleur, et n'induit pas non plus l'obésité ou une maladie autre que le SAPL. Il n'est cependant pas possible de remplacer le modèle animal dans cette expérimentation par une méthode alternative.

Seules les expériences indispensables seront réalisées. Il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Il n'y a pas de procédure chirurgicale. Une analyse statistique des résultats sera réalisée (analyse de variance ANOVA)

7518 La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 et utilise le foie comme organe receveur de la greffe. Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulinoindépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donateurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. La phase initiale de la greffe est délicate, elle se heurte à deux obstacles majeurs :

- Le faible nombre d'îlots obtenus à partir d'un pancréas et donc la nécessité de recourir à plusieurs donateurs.

- La perte cellulaire importante des îlots à l'implantation (réaction inflammatoire, stress oxydant et défaut secondaire de vascularisation). C'est sur ce dernier point que notre projet va se concentrer et plus spécifiquement sur l'amélioration de la survie, de la fonction et de la revascularisation des îlots pancréatiques post-transplantation. En effet, une des limites majeures au succès de la transplantation d'îlots pancréatiques est leur revascularisation inadéquate après transplantation. Cette absence de revascularisation entraîne un manque d'oxygène et de nutriments participant ainsi à la perte de près de 70% des îlots injectés dans les tous premiers jours post greffe. C'est pourquoi il est essentiel de développer des stratégies pouvant potentialiser la vascularisation des îlots et donc leur survie. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à une voie moléculaire majeure impliquée dans la stimulation de la vascularisation, appelée voie des HIFs. Plus spécifiquement, nous avons porté notre attention sur des protéines, les prolylhydroxylases (PHD1, 2 et 3) dont le rôle est de dégrader les HIFs et donc d'empêcher la formation des vaisseaux sanguins. Notre étude *in vitro* menée sur îlots pancréatiques de Rat a démontré que si nous inhibons PHD1 la survie, la fonction et la vascularisation étaient augmentées. Ainsi, l'objectif de cette demande est de confirmer ces résultats positifs *in vivo* dans le cadre d'une transplantation d'îlots pancréatiques.

Cette étude sera réalisée sur des rats diabétiques traités à l'insuline, greffés avec des îlots pancréatiques pour mimer le contexte clinique chez le patient humain.

Réduction : Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (339 rats mâles Lewis).

Raffinement : Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de préanesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-opératoire.

Remplacement : Enfin, l'étude consiste à valider *in vivo* les effets bénéfiques de l'inhibition de PHD1 sur la fonction du greffon chez un sujet diabétique en vue de développer un médicament. Ainsi, le recours à des animaux est indispensable.

7519 La Maladie d'Alzheimer (MA) représente à elle seule 60 à 70 % de l'ensemble des démences. Dans plus de 95% des cas la maladie est sporadique c'est à dire que la cause reste inconnue. Dans de très rares cas la maladie est héréditaire. Les premiers signes de la MA sont souvent une difficulté pour les personnes à effectuer des tâches quotidiennes. Par contre, les conséquences les plus invalidantes pour les patients atteints de la MA sont les troubles de la mémoire mais aussi d'autres phénomènes comme la dépression, l'apathie, l'agressivité et l'agitation. L'ensemble de ses symptômes conduit toujours à la perte d'autonomie du patient.

Actuellement, seul quatre médicaments (donepezil, rivastigmine, galantamine et memantine) sont reconnus officiellement pour le traitement de la MA dans le but de ralentir la progression des troubles de la mémoire. Les effets de ces molécules restent modestes et ces médicaments ne sont pas dénués d'effets secondaires dont les plus courants sont des troubles gastro-intestinaux. C'est pourquoi la recherche de nouveaux médicaments pour le MA reste une préoccupation majeure.

Même si l'origine de la MA demeure inconnue, il est généralement accepté que trois phénomènes caractérisent la MA : l'inflammation des tissus nerveux, la présence de plaques amyloïdes et de la modification de la protéine Tau.

Une équipe de chercheur au Texas (USA) a décrit un modèle de la MA, induit par une endotoxine, présentant l'ensemble de ces caractéristiques. Disposer d'un modèle animal proche de la maladie humaine sporadique est une condition indispensable pour faire des avancées thérapeutiques majeures

Dans ce but, afin de proposer un modèle prédictif de la MA, nous nous proposons d'approfondir le travail de cette équipe.

En règle générale, chaque groupe expérimental d'un plan d'étude comporte 10 animaux afin d'obtenir un résultat statistiquement satisfaisant. Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu, soin aux animaux) et d'expérimentation (méthode de manipulation, nombre et durée des tests), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleures possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisé.

Sur une période de 5 ans, l'utilisation de 260 souris est envisagée.

7520 De très nombreuses maladies rares d'origine génétique n'ont actuellement pas de traitement. La thérapie génique par transfert de gène médiée par des vecteurs viraux se place comme une approche très prometteuse dans ce contexte. Dans le cadre des approches de thérapie génique par transfert de gène, le virus associé à l'adénovirus (AAV) est un vecteur de choix pour délivrer un gène sain dans l'organisme. Chaque sérotype présente un tropisme particulier envers les cellules de certains tissus, qui est variable selon les espèces. A l'heure actuelle, la plupart des études de biodistribution comparative ont été réalisées chez la souris et les résultats ne seront donc pas obligatoirement transposables à l'homme. Dans la perspective de réaliser des essais cliniques en vue de la validation de stratégies de thérapie génique et donc de pouvoir choisir avec le plus de pertinence le meilleur vecteur pour chaque application, il est indispensable de pouvoir déterminer la biodistribution de ces vecteurs dans une espèce la plus proche possible de l'homme. Nous souhaitons évaluer la biodistribution de sérotypes validés au préalable dans des études *in vitro* sur des cellules humaines afin de déterminer ceux conduisant au plus fort taux de vecteurs dans les tissus d'intérêt (muscle squelettique, cœur, cerveau) et présentant un faible taux dans les tissus non ciblés (notamment le foie, principal organe filtre) afin d'éviter de possibles réponses délétères notamment immunitaires.

Le design expérimental de cette étude inclut 18 macaques fascicularis mâles (2-3 ans, 3.0 – 3.5 kg) et séronégatifs pour les vecteurs administrés. Les animaux recevront, sous anesthésie générale, une administration d'AAV par voie intraveineuse simple. Chaque sérotype sera administré à un groupe de 3 primates, à la dose de 3×10^{13} vg/kg ($\sim 1 \times 10^{14}$ vg total) ; et ce, pour un total de 6 groupes correspondant aux 6 différents sérotypes.

L'ensemble des vecteurs AAV, quel que soit le sérotype, portera la séquence d'un transgène rapporteur, codant pour une forme sécrétée de phosphatase alcaline d'origine humaine. Les 18 animaux seront suivis durant 1 mois post injection, au terme duquel ils seront euthanasiés pour prélèvements post mortem. Au cours de cette étude, des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie, via une ponction au niveau de la veine fémorale, en pré-injection puis en post-injection avant l'euthanasie. Ces prélèvements sanguins permettront d'assurer un suivi des paramètres hématologiques, biochimiques et marqueurs d'intérêt chez tous les macaques.

Les prélèvements post-mortem (prélèvements de biopsies musculaires et d'organes après l'euthanasie) seront utilisés pour déterminer la biodistribution de chacun des sérotypes et déterminer leur tropisme. Les sérotypes AAV8 et AAV9 serviront de conditions contrôles, vecteurs utilisés dans

d'autres études précédentes, et permettront de comparer plus efficacement le tropisme des 4 autres sérotypes, issus de version hybrides et de la bio-ingénierie.

Cette étude permettra, en outre, de déterminer la meilleure capsid et donc de réduire le nombre d'animaux qui seront utilisés en phase préclinique sur les études à venir sur rongeurs (souris, rats) et gros animaux (chiens, primates notamment). Ce projet s'inscrit donc dans une volonté de « raffiner » et « réduire » le nombre d'animaux utilisés (règle des 3R). Le nombre d'animaux (au nombre de 18) a été réduit au minimum tout en permettant l'exploitation future des résultats.

1-Réduction

Les sérotypes d'AAV sélectionnés dans cette étude sont issus de différentes collaborations, composés de nouvelles capsides ; En particulier, des sérotypes AAV modifiés ont été évalué chez la souris mdx ou sur des cellules myogéniques humaines. Les vecteurs choisis incluent 2 sérotypes déjà couramment utilisés, les rAAV2/8 et rAAV2/9 qui seront utilisés comme condition initiale pour le transfert de gène ; auxquels s'ajoutent 4 sérotypes hybrides modifiés.

La constitution des groupes, à savoir 3 animaux/groupe, est basée sur notre expérience, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure. Afin d'interpréter les résultats de l'étude, un test statistique (Mann and Whitney) sera utilisé pour comparer les différents groupes.

2- Raffinement

Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale par injection intraveineuse se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux). Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude, seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures. Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 quand cela est possible (hors période de suivi post opératoire par exemple).

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre de thérapie génique. Le Centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités (qui sont suivies via un cahier d'enrichissement) : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat (miroirs et chaînes pour favoriser les déplacements verticaux...).

3-Remplacement

Cette étude aura lieu chez le macaque fascicularis. En effet, une telle étude ne peut être réalisée chez le rongeur, des différences nettes inter-espèces ayant été mises en évidence en ce qui concerne la transduction avec les vecteurs AAV. Les études chez le primate non humain apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité et de toxicité de l'AAV, ce qui permet d'extrapoler les résultats à l'homme. Ceci ne peut être obtenu *in vitro* et justifie ici notre recours à des animaux.

7521 Les infections du tractus respiratoire, chez l'Homme, sont les plus fréquentes parmi les pathologies aiguës dans le monde, et constituent la première cause de mortalité chez les nourrissons et les jeunes enfants (environ 2 millions de décès/an). Parmi les agents étiologiques responsables de ces infections, le métapneumovirus humain (hMPV) et le virus respiratoire syncytial humain (VRS) ont un impact majeur, responsables d'environ 30% des hospitalisations pour infections des voies respiratoires dans cette population.

Le présent projet vise à développer des préparations vaccinales et/ou des traitements antiviraux innovants contre ces deux virus, pour lesquels il n'existe aujourd'hui aucune option efficace disponible sur le marché. Malgré le progrès des dernières années dans les modèles *in vitro* de culture cellulaire, il n'est pas possible d'obtenir des informations suffisantes sur l'efficacité et la sécurité d'un vaccin ou d'un traitement antiviral sans faire appel à un modèle animal qui mime la maladie provoquée par ces

virus ainsi que la réponse immunitaire associée. De plus, pour la mise sur le marché d'un médicament immunologique, les lignes directrices européennes édictées par l' « European Medicines Agency » imposent le recours aux modèles animaux. Dans ce sens, les études *in vitro* nous ont permis de développer puis de sélectionner uniquement les candidats les plus prometteurs pour évaluer leur innocuité et leur efficacité chez la souris, le modèle expérimental de choix pour ce type d'infections.

Concernant la procédure expérimentale, le nombre d'animaux utilisés pour le développement de chaque produit sera optimisé, pour réduire au minimum ce nombre.

On estime utiliser un maximum de 240 souris/an (pour 3 expérimentations d'environ 80 souris/test), soit un maximum de 1200 souris pour la durée totale du projet. Ce nombre sera révisé à la baisse si une molécule innovante ou un vaccin efficace sont découverts avant les 5 ans de la durée du projet. Les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à leurs besoins, en groupes sociaux, avec des moyens de nicher et de se cacher dans leurs cages. Les animaux seront manipulés par du personnel formé à la manipulation de ces espèces. De plus, les signes cliniques que l'infection par ces virus provoque chez les animaux sont bien connus par notre équipe. Ils peuvent être anticipés et les manifestations les plus importantes seront traitées pour limiter la souffrance des animaux. Finalement, et toujours sous la supervision d'un vétérinaire spécialisé, chaque expérience avec un nouveau candidat vaccin ou antiviral fera l'objet d'une étude rétrospective avant de lancer un nouvel essai, afin de tirer les leçons de l'étude précédente pour améliorer si possible le programme de soins.

7522 Un anticorps est une protéine produite par le système immunitaire suite à une infection naturelle ou une injection expérimentale et qui peut reconnaître et se fixer sur la molécule qui lui est spécifique. L'utilisation des anticorps est utile dans plusieurs domaines de la recherche fondamentale et appliquée telle que la biochimie, la biologie, le diagnostic médical, etc.... Les chercheurs recourent à l'animal pour développer de nouveaux anticorps en fonction de leurs besoins et de l'avancée des connaissances.

Les anticorps sont récoltés après plusieurs immunisations par une prise de sang, dans le sérum qui est la fraction liquide obtenue après coagulation. Le sérum obtenu après plusieurs injections de l'antigène contient normalement plusieurs espèces d'anticorps différents dirigés contre plusieurs déterminants antigéniques de la même cible et est appelé antisérum polyclonal. Avec un tel mélange, une même molécule d'antigène peut fixer en même temps plusieurs anticorps différents, chacun sur son épitope spécifique (déterminant antigénique qui correspond à la partie reconnue par l'anticorps ou paratope) et pour certaines applications le sérum polyclonal est donc plus intéressant que le sérum monoclonal, d'autant plus que ce dernier est limité à la souris et est plus long à obtenir.

Les principales injections sont sous-cutanées, intradermiques, ou intramusculaires pour que l'antigène reste le plus longtemps possible à l'endroit où il a été injecté afin de favoriser sa rencontre avec les cellules immunocompétentes. Pour ralentir la libération de l'antigène et augmenter l'efficacité de la réponse humorale on combine généralement l'antigène à des adjuvants, le plus utilisé est l'adjuvant complet de Freund (pour la première injection) ou l'incomplet pour les suivantes

Certaines espèces sont particulièrement employées pour produire des anticorps : le lapin, la souris, le rat, la chèvre, le mouton et le cheval. Le choix de l'animal repose sur divers critères immunologiques et sur des contraintes éthiques, économiques et expérimentales. Le lapin est considéré comme un animal intermédiaire peu coûteux, facile à manipuler, particulièrement efficace : leurs anticorps ont une affinité 10 à 100 fois plus élevée comparativement aux anticorps de souris

Ce projet va utiliser 12 lapins pour produire des anticorps contre des cibles désignées par des chercheurs dans le cadre de leurs projets de recherche.

Remplacement : Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant de produire des anticorps polyclonaux, vu la complexité de la réponse immunitaire. La seule et l'unique procédure est l'immunisation d'animaux de laboratoire par les antigènes.

Réduction : Nous maîtrisons les doses et les voies d'injections nécessaires pour avoir une bonne réaction immunitaire. Deux lapins seront suffisants pour chaque cible et permettent d'avoir un volume de sérum qui aurait requis beaucoup plus de rongeurs.

Raffinement : l'injection des antigènes n'est pas une source de pathologies douloureuses entraînant une souffrance animale. Les prises de sang seront faites dans les conditions de calme pour ne pas

stresser les animaux. L'observation quotidienne des animaux et des points limites à ne pas dépasser garantiront que ces animaux n'auront pas à souffrir plus que ces contraintes légères

7523 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI), débutant généralement chez les jeunes adultes et sans traitement curatif. Touchant environ un habitant sur 1000 en France, c'est un problème de santé publique pour les pays développés. Maladie d'origine multifactorielle, sous l'influence de facteurs génétiques et environnementaux, un déséquilibre de la flore intestinale, ou dysbiose microbienne, serait à l'origine d'une dérégulation de la réponse immunitaire intestinale. La fibrose intestinale (FI) est une complication fréquente qui touche plus de 80% des patients atteints de MC, elle conduit parfois à l'occlusion, nécessitant hospitalisations et traitement chirurgical. La FI est liée à la transformation de certaines cellules présentes dans la muqueuse intestinale qui subissent la pression d'un stimulus inflammatoire chronique et continu. Ces cellules, appelées myofibroblastes, induisent la fibrose en modifiant alors leur environnement. A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif ou préventif de ces processus fibrotiques.

Plusieurs arguments cliniques et expérimentaux suggèrent un rôle important des champignons, notamment des levures du genre *Candida*, dans le maintien et l'exacerbation de l'inflammation intestinale au cours de la MC. Ces champignons appartiennent à la flore naturellement présente dans le tube digestif humain. Le rôle de cette flore fongique sur l'évolution de la FI n'a jamais été étudié à ce jour. D'autres études ont montré que ces champignons pouvaient interagir avec des bactéries pathogènes du tube digestif, ce qui pourrait amplifier la réponse inflammatoire associée à la MC.

L'objectif du présent projet est d'évaluer l'impact d'un déséquilibre de la flore microbienne impliquant des espèces fongiques sur la sévérité de l'inflammation intestinale et son évolution vers la FI.

Pour atteindre cet objectif, nous utiliserons un modèle murin de FI, bien connu et parfaitement maîtrisé par l'un des expérimentateurs. Cette fibrose sera obtenue après une colite chronique induite oralement par un composé chimique administré dans l'eau de boisson de manière répétée et cyclique, le dextran sulfate sodium (DSS). Les études *in vitro* sont insuffisantes pour modéliser la complexité du phénomène inflammatoire et pour évaluer l'intervention des différents tissus impliqués. Le modèle murin est donc indispensable, là où les études sur des tissus humains ne sont pas éthiquement réalisables.

Dans le but de réduire le nombre d'animal utilisé, le projet sera découpé en deux phases : une phase préliminaire incluant les champignons seuls, permettant de déterminer s'il est nécessaire de s'engager dans la seconde phase associant les bactéries aux champignons. De plus, la première phase permettra également d'affiner les expériences suivantes, par la sélection uniquement des espèces fongiques actives sur la FI. Dans la phase préliminaire, impliquant uniquement des espèces fongiques, un nombre minimal de 64 souris a été déterminé afin d'assurer l'interprétation des résultats. La seconde phase impliquera des bactéries, potentiellement néfastes ou bénéfiques sur l'inflammation intestinale, seules ou associées aux champignons. Au total, nous estimons le nombre total de souris nécessaire à 320. Pendant toute la durée de l'expérience, une évaluation clinique quotidienne permettra de dépister la souffrance animale. Les animaux seront euthanasiés en cas d'atteinte du point limite et en fin d'expérience pour évaluer la fibrose digestive par analyses tissulaire et moléculaire des diverses parties du tube digestif.

Ainsi, ces expériences devraient nous permettre une meilleure compréhension des mécanismes conduisant à la FI dans la MC, et d'en déduire une application thérapeutique potentielle.

7524 Jusqu'à 20 % des femmes enceintes sont confrontées durant leur grossesse à de troubles de l'humeur telle que la dépression. Les traitements les plus populaires contre la dépression maternelle sont les antidépresseurs de la famille des inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS) et 5-10 % des femmes enceintes sont traitées par ces médicaments. Des recherches récentes démontrent que le traitement par ISRS pendant la grossesse peut modifier de manière significative le comportement chez les nouveaux nés et les enfants, sans malheureusement avoir un effet thérapeutique chez les mères. Par ailleurs, il reste de nombreuses questions quant aux implications à long terme d'une exposition indirecte à ces antidépresseurs durant la grossesse et l'allaitement pour le développement des enfants. L'objectif de ce travail est de déterminer l'effet de l'exposition

périnatale aux ISRS sur les paramètres neurobiologiques de la mère et de sa progéniture, en utilisant un modèle de stress et de dépression maternelle chez le rat.

De nombreuses études ont montré que l'exposition périnatale aux ISRS peut contrecarrer le développement normal des comportements sociaux chez les enfants : des enfants de 4 ans qui ont précédemment été exposés de manière prénatale aux ISRS montrent plus de comportements d'externalisation (agression, attention et hyperactivité, et comportement de défiance) ainsi qu'une augmentation des comportements d'internalisation (dépression, anxiété...). De plus, des études épidémiologiques suggèrent très fortement que l'exposition périnatale aux ISRS augmente la probabilité de développer des traits autistiques. Chez les modèles animaux, le traitement postnatal aux ISRS diminuent le comportement de jeux chez les juvéniles et affecte les comportements de reproductions. La trajectoire développementale de ces effets et les cibles physiologiques des différents types de médication restent cependant à déterminer.

Le but de notre projet est de déterminer comment l'exposition périnatale à deux ISRS les plus couramment utilisés, fluoxétine (Prozac) et sertraline (Zoloft), sont capables d'affecter de façon spécifique le développement des interactions sociales, y compris les comportements de reproduction, et les paramètres neurobiologiques sous-jacents chez la descendance mâle et femelle rat, en utilisant un modèle de stress maternel et de dépression.

Cette étude dépend de processus très clairement liés à la présence du placenta et des interactions complexes entre le fœtus et la mère, raison pour laquelle des études *in vivo* à l'échelle de l'organisme entier sont inévitables (Remplacement). 2 expériences pilotes seront réalisées : 1) l'une sur des rates gestantes afin de définir les doses adéquates d'antidépresseurs de façon à mimer l'exposition humaine. 2) L'autre, sur des mères et 1 descendant mâle par mère, sera nécessaire pour mettre au point une méthode d'électroencéphalogramme, de façon à étudier la synchronie d'activité neurale entre la mère et son jeune lors d'interactions sociales. Les expériences principales seront réalisées sur des rates gestantes et sur leur descendance. Les mères gestantes seront réparties en 6 groupes 1. Control (pas de stress, pas de ISRS), 2. Stress (pas de ISRS), 3. Fluoxetine, 4. Stress+Fluoxetine, 5. Sertraline, and 6. Stress+Setraline. Une dose de 5 ou 10mg/kg/jour sera administrée aux mères gestantes, sur la base des doses administrées chez les femmes durant leur gestation et sur la base de notre première expérience pilote. Le traitement sera administré via un biscuit vanillé contenant l'ISRS ou son solvant durant la grossesse et durant la l'allaitement, jusqu'au moment du sevrage. Ce type de traitement mime la situation clinique chez les humains (traitement oral) et surtout élimine le stress potentiel de l'administration chez la mère (Raffinement). Ces doses utilisées pour les ISRS ne sont pas toxiques et ne provoquent pas de malformation chez les nouveau-nés. Dans le cas très improbable de souffrance d'un individu au cours de la procédure expérimentale, les mesures appropriées de réduction de la douleur seront employées. Le nombre d'animaux totaux utilisés dans cette expérience est limité et est le nombre minimum qui devrait nous permettre, s'il y a des effets, d'obtenir des différences statistiquement significatives et scientifiquement utilisables (Réduction). Nous étudierons les comportements de jeux juvéniles et les interactions sociales, y compris comportement de reproductions chez l'adulte. Nous nous attacherons également à définir les mécanismes neurobiologiques associés aux changements de comportements. Ses études seront réalisées chez la descendance mâle et femelle, car des travaux précédents ont démontré des effets différentiels des ISRS sur les 2 sexes. Cette étude utilisera un total de 502 rats (y compris stimulus sociaux) sur une durée 5 années. Cette étude devrait nous permettre d'améliorer nos connaissances sur les risques et bénéfices de l'utilisation de la fluoxétine et sertraline dans le traitement de la dépression maternelle durant la période périnatale.

7525 La radiothérapie est le deuxième traitement utilisé pour combattre le cancer, après la chirurgie. De récentes recherches ont démontré que la combinaison de la radiothérapie avec l'immunothérapie permet de régresser la maladie, en particulier sur des cas de cancers métastatiques comme le cancer du poumon.

Malgré une bonne efficacité de traitement, la radiothérapie provoque des lésions significatives sur le poumon pour environ 30% des patients qui ont été irradiés entraînant une pneumopathie. Deux phases ont été décrites. Tout d'abord une phase aiguë de pneumopathie qui peut se produire de plusieurs semaines à 6 mois pouvant conduire à la mort du patient si un large volume du poumon a

été affecté. Puis, une deuxième phase, la phase tardive qui survient entre 6 et 12 mois, provoquant principalement une fibrose pulmonaire (excès de tissus conjonctifs dans le poumon entraînant une gêne respiratoire, une dysfonction de l'organe conduisant à des destructions irréversibles de l'architecture du poumon).

Certaines voies de signalisation sont impliquées dans l'échappement immunitaire de tumeurs murines et humaines en induisant l'inactivation du système immunitaire. En bloquant ces voies de signalisation, il serait alors possible de rétablir ou d'augmenter l'immunisation induite par l'irradiation et donc l'efficacité du traitement. De nombreux essais cliniques sont en cours combinant l'immunothérapie avec l'irradiation pour le traitement de différents types de tumeurs solides. Cependant, peu de données sont disponibles concernant la toxicité de ces combinaisons thérapeutiques.

L'essentiel du projet sera consacré d'une part à déterminer l'efficacité de combinaisons anti-PD1 et radiothérapie sur des modèles de cancer, et d'autre part à étudier les interactions entre l'anti-PD1 et la fibrose pulmonaire radioinduite. Les contraintes et dommages pour les animaux seront donc essentiellement de deux natures : la greffe de tumeurs avec atteinte orthotopique (au site naturel de la tumeur) et l'irradiation localisée en doses radiothérapeutiques, pouvant déclencher des fibroses radio-induites.

Afin de déterminer la toxicité associée à la combinaison de l'irradiation avec l'immunothérapie, seul un modèle *in vivo* pourra nous apporter les informations nécessaires. En effet, le type d'interaction évalué est complexe et inclut le rôle de la radiothérapie sur les différents tissus ciblés : du système immunitaire et du micro environnement. L'organisme vivant entier est indispensable pour étudier ces interactions locales (microenvironnement) et général (médiateurs immunitaires). Il n'existe pas de modèle *in vitro* permettant une telle étude. Le projet nécessite donc d'être mené sur un organisme vivant disposant d'un système immunitaire.

Nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. Le développement de la tumeur, ainsi que les signes de toxicité (perte de poids, prostration) seront évalués 3 fois par semaine (euthanasie des souris dès qu'un point limite est atteint). Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. Tous les animaux bénéficieront d'un enrichissement environnemental sous forme de cocons et de maisons en carton en tout temps. En effet, une analyse statistique a priori a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 1160 souris.

Cette approche pourra notamment améliorer les modalités de traitement de patients affectés du cancer, en minimisant les effets secondaires associés à la radiothérapie.

7526 Différentes études ont mis en évidence la relation liant l'apparition de certaines maladies comme le diabète ou les maladies cardiovasculaires au mode de vie et aux régimes alimentaires. Elles ont particulièrement souligné la responsabilité des lipides (cholestérol, acides gras saturés) comme facteurs de risques majeurs. Parallèlement, un intérêt important et encore croissant est porté aux acides gras polyinsaturés (AGPI) comme agents préventifs, voire dans certains cas, thérapeutiques, de nombreuses maladies chroniques.

L'importance nutritionnelle et la compréhension des mécanismes biochimiques mis en jeu par ces AGPI au niveau cellulaire ainsi que la recherche de nouvelles voies thérapeutiques ou de prévention, représentent actuellement un enjeu de santé publique et scientifique. La problématique de ce projet se situe dans le cadre de la valorisation des ressources naturelles dans l'optique de la prévention du risque cardio-métabolique et de son traitement par l'utilisation de compléments alimentaires d'origine végétale. Dans ce cadre, et pour remédier à la diminution des ressources halieutiques, les micro-algues marines peuvent représenter un potentiel de par leur richesse en molécules biologiquement actives à haute valeur ajoutée telles que les oméga-3, les phytostérols et les pigments. La plupart de ces molécules ont un impact sur différents paramètres biochimiques associés à des troubles

métaboliques tels que les dyslipidémies, l'obésité ou le diabète. Les micro-algues, utilisées en tant que complément alimentaire, présentent la capacité de pouvoir fournir, l'ensemble de ces molécules biologiquement actives, le rôle synergétique de celles-ci pourra ainsi être mis en exergue.

L'analyse nutritionnelle à partir de compléments alimentaires d'origine micro-algues ne peut être conduite que sur un organisme animal entier afin d'avoir une réponse physiologique et afin de pouvoir déterminer ses répercussions biochimiques sur des tissus cibles spécifiques tels que le plasma et les tissus cibles tels que le foie, le myocarde ou le muscle squelettique. Le modèle animal retenu, le rat Wistar présentant une dyslipidémie d'origine nutritionnelle, nous permettra d'atteindre les objectifs visés à savoir l'amélioration des paramètres physiologiques et biochimiques des animaux, grâce à des lyophilisats de micro-algues utilisés en tant que complément alimentaire.

Trente-deux animaux seront utilisés pour cette étude, hébergés dans une animalerie en conditions contrôlées (éclairage, température, hygrométrie) et dans le respect de la méthode des 3R. Durant le protocole nutritionnel, aucun prélèvement n'est effectué. Les prélèvements ultérieurs sont effectués après anesthésie. Un suivi de soin journalier sera effectué (suivi de la prise alimentaire, évaluation de l'eau de boisson consommée) ainsi qu'un suivi trois fois par semaine du poids corporel des animaux. Au cours de ces visites, il sera aisé d'observer un comportement éventuel non approprié tel qu'un comportement agressif, un aspect physique pouvant être un signe de carence ou de domination. Le milieu sera enrichi en objets modifiables permettant aux animaux de créer un environnement propice à leur développement et à leur épanouissement.

7527 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. Certains cas de déficiences plaquettaires aiguës ou chroniques, qui peuvent être héréditaires ou bien acquises (par exemple lors des chimiothérapies anticancéreuses) ne peuvent actuellement être traitées que par la transfusion de concentrés plaquettaires. Ces concentrés plaquettaires sont issus du don de sang et représentent une ressource limitée. La production de plaquettes *in vitro*, en vue de pouvoir un jour suppléer au don de sang, en est encore à ses balbutiements et nécessite encore une recherche fondamentale pour comprendre les mécanismes en jeu. *In vivo*, la formation des plaquettes sanguines a lieu dans la moelle osseuse, à partir de cellules hématopoïétiques spécialisées : les mégacaryocytes. Les mécanismes par lesquels ces cellules libèrent les plaquettes sont encore mal connus, mais seraient sous la dépendance du cytosquelette des mégacaryocytes. Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération de plaquettes *in vivo*, nous souhaitons utiliser une technique de visualisation de la formation des plaquettes en temps réel. Pour réaliser ces études *in vivo*, nous utiliserons des souris dont nous marquerons les mégacaryocytes et les plaquettes à l'aide d'un anticorps pour qu'elles présentent une fluorescence verte. Sous anesthésie générale et analgésie, nous observerons la moelle du crâne directement à travers l'os (cette zone est translucide chez la souris) afin de visualiser en temps réel la libération de plaquettes fluorescentes dans la microcirculation sanguine. Cette observation utilisera une technique de pointe, la microscopie confocale multiphoton, afin de limiter les dommages causés au tissu et d'obtenir un maximum d'information tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Nous comparerons la manière dont les plaquettes sont formées dans les souris présentant un défaut du cytosquelette par rapport aux souris témoins.

Remplacer : Etudier ces mécanismes directement dans l'organisme reste indispensable pour élargir nos connaissances afin de pouvoir améliorer la production de plaquettes *in vitro*. Raffiner : Après manipulation, les souris maintenues sous anesthésie générale et analgésie seront euthanasiées avant leur réveil afin d'éviter toute souffrance. Réduire : Le nombre de souris sera réduit par l'utilisation d'un objectif de faible grossissement, ce qui permet d'observer un champ large et ainsi un grand nombre d'événements. Le traitement informatique ultérieur des images compensera la moins bonne résolution due à l'utilisation de cet objectif. Ainsi le projet fera appel à 100 souris contrôles, ainsi que 400 souris présentant un défaut du cytosquelette.

7528 Près de 2,5 % de la population française présente une « allergie au cheval ». La fréquence de ces allergies est en constante augmentation ; elle a doublé en France en 20 ans, parallèlement au développement de la pratique de l'équitation. C'est un problème tant pour les cavaliers que les professionnels de la filière : la fréquence de sensibilisation, de rhinites et d'asthme est ainsi plus élevée chez les palefreniers. Plusieurs études ont également montré une sensibilisation des

populations urbaines et périurbaines sans contact direct avec les chevaux. Dans ce contexte, les chevaux Curly connaissent un engouement depuis une quinzaine d'année en Europe. En effet, ces chevaux aux poils et aux crins frisés sont hypoallergéniques, ne provoquant au pire qu'une réaction allergique modérée, en fonction du type d'animal et de la prédisposition de la personne allergique. Dans certains cas, les Curly pourraient contribuer à une certaine désensibilisation.

La frisure chez le Curly est associée à une mutation dominante dans le gène de la kératine 25. Cependant, certains sujets au poil frisé ne présentent pas cette mutation (sujets « discordants »). Il existe donc une hétérogénéité génétique du phénotype de la frisure, rendant plus complexe la sélection des individus.

Les objectifs de ce projet sont les suivants :

1/ mettre en place un test génétique afin de permettre aux éleveurs souhaitant produire des poulains frisés de savoir, si leurs reproducteurs Curly sont porteur de zéro (individu discordant), une copie (hétérozygote) ou de deux copies (homozygote) de la mutation dans le gène de la kératine 25 ;

2/ observer et répertorier les différents types de frisures chez les chevaux Curly à l'aide de photographies, de prélèvements et d'analyses de poils ;

3/ rechercher la deuxième mutation chez les individus discordants en examinant les différents gènes candidats.

Pour cela, 50 chevaux Curly seront étudiés. Le cheval Curly est au centre du projet en tant qu'espèce cible. Il ne peut pas être remplacé. Des prélèvements de sang seront effectués pour extraction de l'ADN génomique et séquençage du 1er gène de la frisure, et des gènes candidats au phénotype discordant. Du poil et des crins de l'encolure et de la queue seront également prélevés pour examen microscopique et analyse histologique. Les chevaux seront prélevés dans leur élevage ou écurie d'origine ce qui réduira le stress associé à la manipulation. Des échantillons issus de chevaux non Curly déjà en stock au laboratoire serviront de témoins, réduisant ainsi le nombre de sujets nécessaires.

7529 Contexte : L'infection est un motif fréquent d'admission en réanimation et le choc septique, stade le plus grave de l'infection, est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes du choc septique, afin de trouver de nouveaux traitements. Une des principales caractéristiques du choc septique est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. On sait par exemple que les globules blancs, en particulier les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire. Par contre, on connaît beaucoup moins bien le rôle joué par les plaquettes sanguines. Celles-ci sont bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, en s'accumulant au site de lésion vasculaire pour former un agrégat qui arrête les saignements. Dans le choc septique, des résultats récents indiquent que les plaquettes pourraient avoir des effets délétères par l'exacerbation de l'inflammation mais aussi des effets bénéfiques par leurs propriétés anti-infectieuses.

Objectifs : Ce projet vise à mieux comprendre le rôle des plaquettes dans le choc septique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces. Il sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- des traitements antalgiques seront administrés
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état

- les expériences sur animaux vivants auront une durée limitée dans le temps ;
- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort et différents tissus seront prélevés.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules. Le processus inflammatoire suite à une péritonite stercorale est un phénomène multifactoriel qui implique plusieurs types de cellules et des intercommunications qui ne peuvent pas être reproduites de façon complète *in vitro*, tant sur le plan des identités en jeu que sur le plan temporel. La compréhension des processus physiopathologiques est donc impossible chez l'homme, tandis qu'il est nécessaire de recourir à des modèles animaux modélisant au plus près les caractéristiques de la pathologie humaine.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 534 souris.

7530 Nous formons des techniciens en biologie et leur proposons une formation des personnels amenés à appliquer des procédures expérimentales aux animaux (ex-niveau II). Ce type de formation réglementaire à l'expérimentation animale doit permettre l'acquisition de compétences théoriques et pratiques favorisant la manipulation d'animaux dans le respect de leur bien-être. Conformément à l'approbation de cette formation par le Ministère de l'Agriculture, il s'agit d'enseigner aux étudiants les bonnes pratiques pour la réalisation d'expérimentations animales. Les enseignements pratiques de physiologie animale en 1ère année de DUT Génie Biologique ainsi que les enseignements de pharmacologie-toxicologie en 2ème année Analyses Biologiques et Biochimiques (ABB) s'inscrivent dans ce cadre et sont réalisés en effectif étudiant réduit, sous la tutelle d'enseignants et de techniciens expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal. Des enseignements plus théoriques d'éthique, d'éthologie, de physiologie nociceptive viennent compléter ces connaissances afin que les étudiants soient en mesure d'adapter leur pratique au comportement de l'animal qu'ils manipulent. Le choix des rongeurs s'explique par l'utilisation majoritaire de ces modèles animaux en expérimentation, les techniciens en formation étant essentiellement amenés à manipuler ces espèces dans leur entreprise. Le TP « Technique de l'arythmie au chloroforme chez la souris » s'inscrit dans le cadre de l'étude des médicaments du cœur et des vaisseaux et va permettre aux étudiants d'acquérir des connaissances théoriques sur la fonction et le rythme cardiaque, l'ECG ainsi que sur la classe des médicaments anti-arythmiques.

L'utilisation de chloroforme est indispensable car c'est le seul cardiotoxique capable d'induire des troubles du rythme cardiaque variés. Cependant, toutes les précautions d'usage seront prises pour son utilisation et éviter tout contact des expérimentateurs avec la substance.

Après une analgésie avec de la buprénorphine administrée en sous-cutané, la souris sera anesthésiée par voie intrapéritonéale avec un mélange associant kétamine et xylazine puis soumise à l'inhalation d'une faible dose de chloroforme (CHCl₃). Les électrodes seront alors placées en sous-cutané et l'ECG témoin normal sera enregistré. L'expérimentation va se poursuivre par l'inhalation d'une forte dose de chloroforme jusqu'à l'arrêt des mouvements respiratoires puis l'arrêt cardiaque. C'est à partir de l'arrêt respiratoire que les troubles auriculaires et ventriculaires ainsi que les troubles, de l'excitabilité et de la conductibilité induits par l'intoxication au chloroforme seront observables sur le tracé ECG. In fine, il leur sera injecté une dose de doléthal en intra-cardiaque.

Dans les mêmes conditions que précédemment, l'ECG de 2 souris témoins et de 2 souris traitées au préalable, avec un β -bloquant et anti-arythmique, le propranolol, seront enregistrés. L'effet protecteur du propranolol sur les troubles du rythme cardiaque induits par l'intoxication au chloroforme pourra être observé.

Nous formons, par an, jusqu'à 170 étudiants en 1ère année et 60 à 66 étudiants (30 à 33 binômes) en 2ème année ABB chacun devant apprendre à manipuler un animal. Ce projet s'adresse aux étudiants de 2ème année ABB et puisque nous travaillons en binôme, nous n'aurons recours qu'à l'utilisation maximale de 120 à 132 souris sur un an, (4 souris par binômes d'étudiants) soit un total de 600 à 660 souris sur 5 ans. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, les souris utilisées proviennent des enseignements de physiologie animale de 1ère année de DUT Génie Biologique du S1 et de 2ème année ABB année spéciale du S3 lors des TP Techniques de contentions et d'inoculations (projet DR2017-55). Après euthanasie, les souris seront congelées pour être utilisées

en TP de Biologie pour les étudiants en 1ère année de DUT Génie Biologique du S1 et de 2ème année ABB année spéciale du S3 pour l'étude de l'anatomie de la souris, (Réduction et Raffinement).

7531 Les calcinose tumorales sont des calcifications ectopiques formées par des dépôts de cristaux de phosphate de calcium basique (PCB) en dehors du tissu squelettique. Ces calcinose peuvent survenir lors des lésions du tissu comme par exemple après une nécrose tissulaire ou au cours des maladies inflammatoires telles que la dermatomyosite, la sclérodermie et le lupus ou lors des perturbations du métabolisme du phosphore et/ou du calcium comme par exemple au cours des maladies génétiques telles que la calcinose tumorale hyperphosphatémique familiale (CTHF). La CTHF est due à une mutation inactivatrice soit du gène FGF23 soit du gène GALNT3 à l'origine d'une élévation chronique du phosphore dans le sang, ce qui favorise la formation des calcifications ectopiques. Ces calcifications peuvent être responsables de poussées inflammatoires avec des douleurs importantes. Les inflammations répétées peuvent fragiliser la peau et entraîner une plaie cutanée avec un risque de surinfection. Il n'y a actuellement pas de traitement efficace sur les calcifications. Nous avons observé chez un petit nombre de patients que les injections autour des calcifications ou les applications locales transcutanées de thiosulfate de calcium (TSS) permettaient de diminuer à la fois les poussées inflammatoires et les calcifications ectopiques.

Les objectifs de ce travail sont d'étudier i) les effets cellulaires du TSS sur l'inflammation déclenchée par les cristaux PCB, ii) les mécanismes de formations des cristaux calciques et iii) les mécanismes par lesquels le TSS diminue les calcifications ectopiques.

Pour répondre à ces questions, nous utiliserons deux modèles murins et des modèles cellulaires. 1/ Pour étudier *in vivo* l'effet du TSS sur l'inflammation déclenchée par les cristaux de PCB, nous utiliserons le modèle de poche à air qui est un modèle maîtrisé par le laboratoire, déjà évalué par le comité et reconnu au niveau international. La poche, créée en injectant de l'air stérile sous la peau des souris, mime une cavité articulaire. Les effets du TSS sur la réaction inflammatoire induite par des cristaux seront étudiés en analysant la production des protéines inflammatoires et l'infiltrat de cellules inflammatoires dans cavité créée. 2/ Pour étudier *in vivo* les mécanismes de formation des calcifications ectopiques et les effets du TSS sur ces calcifications, nous utiliserons des souris génétiquement modifiées (qui ont une mutation inactivatrice du gène Galnt3). Ces souris Galnt3 déficientes développent dans 50% des cas des calcifications ectopiques (sous cutanées et intra-dermiques) lorsqu'elles sont soumises à un régime riche en phosphore. Les calcifications musculaires peuvent aussi se former lorsqu'on induit une nécrose musculaire par le froid (brûlure par une pince trempée dans de l'azote liquide). Nous étudierons les mécanismes de formation des cristaux et des effets du TSS sur la formations des calcifications ectopiques dans ces deux modèles. Les effets du TSS seront évalués en analysant le nombre et la taille des calcifications et en étudiant *in vivo* le comportement des cellules après les injections ou les applications transcutanées du TSS.

Pour les expériences utilisant la poche à air et évaluant les effets anti-inflammatoires du TSS, 10 animaux/groupe sont nécessaires. Nous utiliserons comme témoin deux autres types de cristaux (un autre type de cristaux de calcium et des cristaux d'urate de sodium qui ne contiennent pas de calcium). Pour les expériences sur les mécanismes de calcifications et les effets du TSS sur les calcifications, 20 animaux/groupe sont nécessaires (seulement la moitié des souris développent des calcifications) dans le modèle régime et 10 souris/groupe dans le modèle nécrose musculaire. Nous effectuerons une cinétique pour caractériser les mécanismes de formation des calcifications et les effets du TSS. Nous utiliserons comme témoin des injections de sérum physiologique. Au total, ce projet utilisera 196 souris sauvages, 310 souris Galnt3 déficientes.

La réaction inflammatoire est complexe et dépend de nombreuses interactions cellulaires qui ne peuvent pas être évaluées uniquement par des tests *in vitro*. De même, les mécanismes de formation des calcifications ectopiques sont multiples et font intervenir des facteurs systémiques, métaboliques et cellulaires qui ne peuvent pas être appréciés par des études *in vitro*. Enfin, les effets *in vivo* du TSS ne sont bien connus. Le TSS peut influencer de nombreuses cellules et systèmes qui ne peuvent être bien analysés que par des expériences *in vivo*. Nous ferons des études *in vitro* pour évaluer ses effets sur la différenciation cellulaire (ostéblastique et ostéoclastique). Les études *in vivo* sont donc indispensables à la compréhension des mécanismes de formation des calcifications ectopiques et les effets du TSS.

Le nombre de 10 animaux/expérience correspond à la quantité minimale nécessaire pour obtenir une puissance statistique suffisante (tests non-paramétriques de Mann-Whitney et Kruskal Wallis). Le nombre de souris sera réduit au minimum grâce aux expériences *in vitro* et aux expériences exploratoires (détermination de la dose, du temps optimal) en utilisant un effectif moins important. Le bien-être des souris sera surveillé par la marche, la prise de poids et la survenue de comportements anormaux. En cas de souffrance identifiée (perte de poids, stéréotypie, repliement, perte de poids) un traitement antalgique sera administré (buprénorphine 50 µg/kg). Les effets du TSS sur les calcifications seront évalués sur deux temps : tout de suite après l'induction lésionnelle (effet préventif) et après la formation des cristaux. Les souris sauvages seront, à la réception dans l'animalerie, réparties de façon aléatoire par groupes. La poche à air ne sera créée qu'après une semaine d'adaptation dans l'animalerie. Les souris Galnt3 sont en élevage dans le laboratoire.

Les résultats attendus permettront de mieux comprendre les mécanismes de formation ectopique des calcifications et de proposer une option thérapeutique sur ces calcifications qui n'ont actuellement pas de traitement efficace.

7532 Les antibiotiques ont façonné la médecine moderne et sauvé des millions de vies. Cependant, le pouvoir de guérison remarquable des antibiotiques a entraîné une généralisation de leur usage parfois excessif conduisant à l'apparition de bactéries résistantes aux antibiotiques. Ce phénomène d'antibiorésistance constitue un problème majeur de santé publique induisant des complications de traitement et l'augmentation des coûts des soins de santé. Chaque année, dans l'UE, les infections bactériennes résistantes aux antimicrobiens entraînent environ 25 000 décès et un coût économique de plus de 1,5 milliard d'euros. Par conséquent, la recherche de nouveaux agents antimicrobiens et de cibles antimicrobiennes est une nécessité urgente.

Notre laboratoire a identifié et caractérisé une protéine bactérienne comme une nouvelle cible thérapeutique dans la lutte contre les infections bactériennes. L'objectif du projet est de caractériser de nouveaux antimicrobiens en utilisant cette protéine comme cible moléculaire. Cette approche constitue une nouvelle voie thérapeutique puisque contrairement à la plupart des antibiotiques actuels, nous recherchons des molécules capables de cibler spécifiquement les bactéries pathogènes au cours d'une infection et permettant de stimuler le système immunitaire. Cette approche devrait permettre de préserver la grande majorité des bactéries non pathogènes présentes normalement au niveau de notre intestin, et ainsi de perturber le moins possible l'équilibre de notre microbiote (ensemble des micro-organismes : bactéries, champignons, virus) intestinal.

Un criblage ciblé à partir d'une collection de 5 millions de composés chimiques a permis la sélection de 105 inhibiteurs potentiels ciblant spécifiquement la fonction de notre cible bactérienne. Des études préliminaires ont été menées pour déterminer l'efficacité et la toxicité de ces inhibiteurs sur des modèles *in vitro*, sur cellules eucaryotes et dans un modèle d'infection chez l'insecte. Ce modèle d'insectes permet de tester plusieurs molécules, diverses doses, les temps et les voies d'inoculation. Toutes ces étapes préliminaires permettent de réduire le nombre de souris qui seront nécessaires pour valider l'efficacité et la toxicité des médicaments candidats les plus prometteurs.

Dans ce projet, nous proposons d'utiliser des souris comme modèle de mammifères pour valider l'efficacité et la toxicité des candidats médicaments les plus prometteurs. Sur la base de nos résultats préliminaires très prometteurs, notre objectif est (i) de tester l'efficacité de ces inhibiteurs sur des bactéries pathogènes présentant un intérêt thérapeutique élevé et (ii) de valider l'innocuité des molécules vis-à-vis de l'hôte.

À la fin du projet, nous visons à obtenir au moins une molécule candidate préclinique avec un potentiel thérapeutique élevé.

Ce projet répond donc à un besoin médical et sociétal et devrait permettre de trouver des alternatives aux antibiotiques actuels pour lutter contre les phénomènes d'antibiorésistance.

-Remplacement

Notre projet se base sur de nombreux résultats préliminaires qui ont permis de valider l'innocuité des molécules et leur efficacité sur des modèles *in vitro*, sur cellules eucaryotes et sur un modèle *in vivo* d'insectes. Toutes ces étapes préalables permettent de réduire le nombre de souris nécessaires pour valider l'efficacité et la toxicité des médicaments candidats les plus prometteurs. Ce projet vise à

obtenir de nouveaux médicaments candidats qui pourraient être utilisés pour des études précliniques. En raison de son application en thérapeutique humaine, les données doivent obligatoirement être validées dans un modèle mammifère d'infection.

-Réduction

Tout d'abord, une étude pilote sera entreprise pour déterminer les paramètres optimaux d'inoculation (640 souris max). Les conditions optimales déterminées à partir de l'étude pilote seront utilisées dans une étude finale pour analyser l'effet antimicrobien des molécules pendant l'infection (1460 souris pour la toxicité, 540+1350= 1890 souris pour l'efficacité des molécules contre 6 pathogènes d'intérêt médical et 365 souris pour les tests de spécificité des molécules). Au total, 4355 souris seront nécessaires à cette étude.

Le nombre d'animaux est ainsi adapté au plus juste pour permettre une évaluation de l'innocuité des molécules et de leur efficacité.

-Raffinement

Le protocole expérimental préconise l'anesthésie des animaux pour limiter la douleur. D'autre part, il permettra de décider d'une euthanasie prématurée en cas de comportements anormaux des animaux suite à l'infection traduisant un mal être. Les marqueurs classiques de la santé animale seront surveillés, tels que le poids, le comportement général, la récupération et des signes de détresse. Les animaux seront hébergés dans les conditions standard d'habitat avec enrichissement. Les animaux seront regroupés à 5 par cage pour respecter le caractère social des souris.

7533 Nos travaux antérieurs concernent la polykystose rénale autosomique dominante (PKD), une maladie héréditaire monogénique provoquée par la mutation des gènes PKD1 ou PKD2 codant pour les polycystines PC1 et PC2. Une analyse protéomique par spectrométrie de masse nous a conduit à identifier plusieurs protéines interagissant avec PC2, en particulier, une protéine du réticulum endoplasmique de fonction encore inconnue : TMEM33. Nous avons dans un premier temps démontré *in vitro* un rôle pro-apoptotique de TMEM33 sur une lignée de cellules rénales épithéliales. Afin d'explorer le rôle de TMEM33 *in vivo* nous allons réaliser une étude comparative des fonctions rénales des souris contrôles (WT), invalidées pour TMEM33 (KO) et surexprimant TMEM33 (TG) après induction de lésions rénales aiguës (AKI Acute Kidney Injury). Cette étude permettra d'étudier la fonction de TMEM33 dans la pathologie rénale.

Pour mener à bien ce projet, il sera nécessaire de recourir à 720 souris.

Nous avons conçu notre plan expérimental dans le souci de la règle des 3R :

-Remplacement : nous avons d'ores et déjà élucidé les mécanismes *in vitro* qui sous-tendent notre hypothèse. Nous avons besoin de les valider dans un organisme entier tel que la souris car pour le moment, aucun système *in vitro* ne nous permet de reproduire l'ensemble des mécanismes physiologiques d'un organisme entier. L'utilisation du modèle primate est très compliquée tant d'un point de vue éthique, financier et pratique. De par ses similarités avec la physiologie, la souris constitue le meilleur modèle pour adresser nos questions dans une perspective préclinique.

- Réduire : nous avons effectué une large recherche bibliographique afin de nous assurer de ne pas dupliquer des protocoles expérimentaux déjà réalisés. Cette recherche bibliographique nous a permis d'optimiser nos procédures et le nombre d'animaux à utiliser afin d'obtenir des résultats statistiques exploitables, robustes et valables. (logiciel G*Power)

- Raffinement : Le raffinement de notre projet s'effectue à partir de la naissance des souris et tout au long des procédures. Cela débute par la reproduction et le maintien des animaux dans une animalerie conventionnelle et agréée avec le personnel formé et habilité et le respect de la taille d'hébergement en fonction du nombre d'animaux. Des dispositifs d'enrichissement de milieu (un igloo et carrés de ouate compressée) sont présents dans toutes les cages. Durant la phase expérimentale, le personnel technique habilité et formé, veillera à l'application de procédures visant à minimiser toute souffrance ou stress (notamment anesthésie/analgésie), réalisera les tests et notera toutes remarques pertinentes durant ou après la réalisation des tests expérimentaux sur des fiches de suivis (annexe1). Ces fiches incluent des grilles de scores avec des points limites précis, clairs et adaptés à nos expérimentations. La mort n'étant pas un point limite acceptable, nous sortirons les souris de l'étude

lorsqu'un des points limites sera atteint et en cas de nécessité nous pratiquerons une euthanasie d'urgence.

7534 Contexte : La vaccination avec acides nucléiques produits par génie génétique présente de nombreux avantages de sécurité, coût, et d'adaptabilité aux pathogènes émergents. Alors qu'elle a montré une bonne efficacité dans les modèles murins, sa transposition aux espèces d'application (homme, animaux domestiques) nécessite des ajustements, notamment en ce qui concerne son mode d'administration.

Objectif : Evaluer la réponse immune précoce et locale après administration de vaccins avec acides nucléiques dans la peau de porc par différentes méthodes peu invasives : électroperméabilisation de surface (application d'un champ électrique pour perméabiliser les cellules), jet sous pression sans aiguille, patches.

Bénéfices scientifiques : Connaitre la réponse immune locale induite par différentes méthodes de d'administration pour identifier les cellules et protéines qui président à la mise en place de l'immunité mémoire et protectrice. Cette connaissance permettra d'ajuster, dans des projets ultérieurs, le mode d'administration à la composition vaccinale. Elle contribuera à déterminer si l'administration par jet sous pression ou par patches peut se substituer à l'électroperméabilisation qui est la technique de référence, et à donner des pistes pour améliorer l'efficacité de ces nouvelles techniques. En effet, ces nouvelles techniques sans douleur, sans aiguilles, plus simples et plus rapides (un seul geste) seraient mieux tolérées par les animaux que l'électroperméabilisation.

Bénéfices vétérinaires : cette expérience permettra d'évaluer quel est le meilleur compromis entre réponse locale, plus ou moins inflammatoire et donc possiblement associée à de l'inconfort ou de la douleur, et efficacité d'induction des réponses mémoires protectrices. En effet, l'efficacité de la vaccination semble associée à une réponse inflammatoire précoce mais il est nécessaire de la limiter pour éviter l'excès de douleur, tout en conservant son efficacité.

Bénéfices sociétal et médical : les informations de réponse locale et précoce à la vaccination avec acides nucléiques chez le porc, dont la peau et la réponse immune sont proches de celles de l'homme, pourront servir de base préclinique pertinente pour la recherche biomédicale.

Bénéfice environnemental : vaccination avec acides nucléiques est sûre pour l'environnement, à la différence d'autres modes de vaccination tels que certains vaccins atténués qui sont encore largement utilisés chez le porc, faute de solution de remplacement.

Principe des 3 R : 12 porcs Large White post-sevrage seront utilisés.

Remplacer : la réponse immune locale implique la réponse inflammatoire, donc l'afflux de cellules par le sang dans la peau, qui conduit à des interactions cellulaires complexes et multiples, qu'il n'est pas aujourd'hui possible de reproduire de manière fiable *in vitro*.

Réduire : nous utiliserons un maximum de 12 porcs pour l'expérience, et nous ferons le maximum pour réduire ce nombre. Si les variations de réponses individuelles sont peu importantes, 6 porcs pourront suffire. Les animaux utilisés sont des porcs qui proviennent d'élevages autorisés.

Raffiner : l'administration des vaccins sera réalisée sous anesthésie pour limiter le stress et l'inconfort, et possiblement la douleur, induits par l'électroperméabilisation, technique de référence, utilisée en essai clinique chez l'homme. Les animaux seront hébergés en groupe de 6 et l'environnement sera enrichi avec des jouets. Etant donné la durée de l'expérience (24h post administration), notre forte expérience acquise sur toutes ces méthodes de délivrance chez le porc, et leur utilisation en essai clinique chez l'homme, aucune souffrance nécessitant l'arrêt n'est attendue. Toutefois une grille de douleur sera établie et nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Si une inflammation aigue avec nécrose était observée après l'administration d'acides nucléiques (ce qui est très improbable), les porcs seraient euthanasiés.

7535 Nous nous intéressons à la sclérodémie systémique (ScS), une maladie auto-immune rare (9/100000 habitants) et au pronostic vital sombre dans les formes sévères. Elle associe une vasculopathie sévère (atteinte des cellules endothéliales des petits vaisseaux), des anomalies immunologiques (présence d'auto-anticorps et de cellules immunes auto-réactives) et une fibrose touchant la peau et

les organes internes. A ce jour, il n'existe aucune thérapeutique efficace contre la fibrose qui est responsable d'une altération profonde de la qualité de vie des patients et qui grève leur espérance de vie, notamment quand la fibrose touche les organes vitaux comme les poumons par exemple.

Le rationnel de cette étude repose sur :

-l'observation clinique de l'amélioration spectaculaire d'une fibrose évoluée chez un patient sclérodermique, après traitement par un inhibiteur de la topoisomérase-1 (irinotecan) dans le cadre d'un cancer du rectum. Dès la deuxième perfusion de chimiothérapie, le patient ressentait une amélioration très forte de son état cutané avec une diminution de l'épaisseur de la peau et de son induration et un gain de souplesse cutané lui permettant d'améliorer significativement sa qualité de vie.

-la réalisation d'une étude *in vitro* qui montrait qu'un des trois produits de chimiothérapie qu'il avait reçu, l'Irinotecan, diminuait de façon importante la production de collagène par les fibroblastes et donc potentiellement la fibrose.

Ces observations ont fait l'objet d'un dépôt de brevet sur l'utilisation de l'irinotecan à visée anti-fibrotique au cours de la sclérodermie.

Il n'y a pas de méthode alternative dans la mesure où seul un modèle murin nous permettrait d'apporter la preuve de concept de l'intérêt de l'utilisation de l'Irinotecan à des fins anti-fibrotique chez les patients sclérodermique en préventif et en curatif. L'intérêt du modèle animal choisi est qu'il permet l'induction d'une fibrose cutanée comparable à celle observée chez les patients sclérodermiques.

L'objectif de cette étude est donc de montrer dans un modèle animal de sclérodermie l'effet de l'Irinotecan sur :

- la limitation/la prévention de l'apparition de la fibrose lorsque celle-ci est en cours d'installation (= modèle préventif)
- la réversion de la fibrose lorsque cette dernière est déjà installée (=modèle curatif).

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences, 120 souris BALB/c sur une période d'un an. Dans le respect de la règle des 3R, le nombre d'animaux a été définis d'un point de vue statistique. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leurs naissances à leurs morts afin d'éliminer ou de réduire au minimum toute douleur, souffrance ou angoisse ou tout dommage durable susceptible d'être infligé aux animaux

7536 Chez l'homme, l'électroencéphalogramme (EEG) permet d'enregistrer l'activité électrique produite par les neurones grâce à des électrodes placées sur le cuir chevelu, au niveau de zones fonctionnelles précises. Le signal recueilli étant de très faible voltage, il est amplifié et transcrit sur un enregistreur informatique, puis analysé. Il existe une approche plus précise, la technique de stéréo-électroencéphalographie (SEEG), qui se pratique exclusivement en milieu hospitalier spécialisé, les électrodes sont implantées directement dans le cerveau par chirurgie robotisée. L'EEG est l'examen de référence pour le diagnostic et le suivi de l'épilepsie.

Parmi les maladies neurologiques, les épilepsies tiennent la deuxième place, juste derrière la migraine. Elles touchent près de 1 % de la population française, soit environ 600 000 malades dont la moitié sont des enfants. Seul un symptôme, le « grand mal », perte de connaissance et contorsions au sol, est identifié par le grand public, alors qu'ils se comptent par centaines. L'EEG permet d'apprécier l'efficacité du traitement et la régression des anomalies.

La compréhension des mécanismes physiologiques et moléculaires des différents syndromes épileptiques ainsi que les pathologies du système nerveux central avec l'épilepsie en comorbidité requière des enregistrements EEG. La technique d'EEG est également appliquée dans d'autres affections du système nerveux central telles que les troubles de la conscience et de la vigilance ou pour évaluer les troubles du sommeil. D'autres part, l'activité EEG peut aussi être appliquée dans des conditions physiologiques telles que des évaluations de processus d'apprentissage.

Remplacement : L'utilisation des modèles animaux dans le domaine de l'épilepsie permet d'accroître la connaissance sur les origines, conséquences et le traitement. De plus, le syndrome épileptique ne peut s'étudier que sur un organisme entier étant donné la complexité de la physiologie du cerveau.

D'autre part, le génome de la souris est entièrement connu et aisément manipulable, ce qui permet de multiples applications comme l'invalidation de gènes. Grâce à ces approches, de nombreux modèles de souris épileptiques ont été générées ces dernières années.

Raffinement : L'intérêt majeur de l'EEG est la sensibilité de la technique, qui permet une détection de crise de faible intensité. Chez la souris, l'enregistrement EEG se réalise grâce à des électrodes placées à demeure sur la boîte crânienne. L'implantation de ces électrodes se fait sous anesthésie générale. Les crises épileptiques, chez l'animal comme chez l'homme, n'entraînent pas de douleur. Lors de crises sévères, il y a perte de connaissance. Au réveil, peuvent subsister des douleurs musculaires sans gravités. Les animaux seront observés quotidiennement et en cas d'observation de douleur, les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés, pour éviter toutes souffrances.

Réduction : Les enregistrements EEG peuvent être réalisés à de multiples reprises sur les mêmes individus. Ceci permet l'accumulation de suffisamment de données sur un nombre réduit d'animaux utilisés ainsi qu'une optimisation des données obtenues. Le nombre de 5 individus est considéré comme valable pour la mise en évidence d'évènements épileptiques.

Pour mieux comprendre les causes de ces différents syndromes épileptiques, notre unité souhaite mettre en place cette technique d'enregistrement EEG qui est très sensible et procéder à la validation de cette technique. La validation des enregistrements se fera grâce à l'utilisation de 2 modèles pharmacologiques sur un effectif de 5 animaux par modèles soit 10 souris au total. La mise en place de la technique chirurgicale nécessitera un maximum de 20 souris portant ainsi le total d'animaux utilisés à 30 souris maximum.

7537 Les synéchies intra-utérines sont des adhérences se formant au sein de l'utérus au niveau de la muqueuse endométriale. Elles surviennent après une agression de la muqueuse utérine et particulièrement après des interventions chirurgicales fréquentes en gynécologie (curetage, myomectomie, avortements spontanés, accouchement). Les synéchies sont donc une pathologie fréquente de la femme jeune et entraînent des problèmes de douleurs pelviennes chroniques mais surtout des problèmes d'infertilité. Dans le cadre d'un projet scientifique visant à développer un dispositif anti-adhérentiel résorbable et efficace sur la prévention des synéchies intra-utérines, une collaboration entre cliniciens et chimistes, initiée en 2013, a permis de mettre au point un prototype présentant une validation en termes d'efficacité et de tolérance *in vitro* (travaux en cours de publication, sous couvert d'un brevet français). En parallèle de ces travaux, une modélisation en 3 dimensions est en cours, à partir d'échographies utérines pour envisager secondairement une phase de tests précliniques.

Des travaux expérimentaux, menés sur modèles animaux ont donc été envisagés afin de valider l'efficacité et la tolérance du dispositif à l'échelle *in vivo*. Comme tout dispositif, la validation en termes d'efficacité nécessite des résultats *in vitro*, qui sont toutefois insuffisants pour l'évaluation complète en termes d'efficacité et de non innocuité. La phase de validation *in vivo* est indispensable pour pouvoir envisager une application clinique pour la femme. Un modèle d'adhérences intra-abdominales chez le rat a été mis au point et a permis de valider l'efficacité anti-adhérentielle de notre dispositif au niveau intra-abdominal. Le projet présenté ici repose sur des tests d'efficacité et de tolérance chez la ratte en termes de reproduction, par la validation de l'amélioration de la fertilité spontanée après mise en place du prototype modélisé à l'échelle du petit animal. Le nombre d'animaux nécessaires a été estimé à 29 rattes, qui seront randomisées pour la mise en place du prototype dans la corne droite ou gauche selon le groupe de randomisation. 5 mâles seront également nécessaires pour la mise à la reproduction. Les animaux bénéficieront d'un délai d'acclimatation de 7 jours avant la procédure. Afin de limiter la douleur des animaux une anesthésie pour la chirurgie initiale sera réalisée : injection IP de Kétamine (80 mg/kg) et de xylazine (5mg/kg) associé à une anesthésie locale par injection sous-cutanée de lidocaïne 1 % pour réduire les douleurs post opératoires. Une analgésie post opératoire sera également administrée en systématique, il s'agit de la buprénorphine (0,02mg/kg).

L'enrichissement des cages est prévu en utilisant dans chaque cage des Top Brick qui sont des modules de cœur de bois de peuplier qui permettent de développer l'activité d'exploration de l'animal et de participer à son bien-être.

Nous avons défini certains points limites (perte de poids de plus de 15%, absence d'alimentation, lâchage de la suture abdominale) au-delà desquels nous interrompons la surveillance avec euthanasie de l'animal. Le respect du bien-être animal a également été pris en compte tout au long de la procédure et de la surveillance quotidienne. Nous espérons ainsi pouvoir valider l'efficacité des tests *in vivo*, après un curetage des 2 trompes responsable d'un défaut de cicatrisation, en observant une amélioration de la fertilité dans les trompes ayant reçu le prototype par rapport aux trompes témoins.

7538 La prévalence du diabète ne cesse d'augmenter dans nos populations. Une de ses formes, le diabète de type 1 est caractérisé par la destruction des cellules Bêta des îlots de Langerhans conduisant à un taux élevé de glucose dans le sang (hyperglycémie). Le plus souvent les patients ont recours à un traitement consistant en l'injection d'insuline. La thérapie cellulaire du diabète a montré son potentiel réel dans le traitement de cette maladie. Techniquement, une fois les îlots isolés de pancréas issus du don d'organe, ceux-ci sont greffés dans le foie (via la veine porte). Implantés, ils retrouvent leur fonction et permettent un bon équilibre de la glycémie. Le foie est aujourd'hui le site de choix pour la transplantation des îlots, mais son abord n'est pas sans risque (hémorragie, thrombose.). De nombreux sites sont testés en laboratoire, ainsi nous souhaitons aborder et évaluer le site sous-cutané sur des souris.

Nous transplanterons des îlots de Langerhans en sous-cutané, nécessitant une chirurgie à douleur faible sur 48 souris SCID immunodéficientes (12 souris par pancréas traités - 4 pancréas envisagés). Nous suivrons les animaux pendant 1 mois pendant lequel nous analyserons leur glycémie et le taux d'hormone dans le sang (insuline).

Suite à ce suivi les animaux seront envoyés dans un laboratoire spécialisé en imagerie du petit animal pour étudier les cellules humaines sur animal vivant.

Afin de respecter la règle des "3R", les animaux seront hébergés et traités avec soin (nourriture et eau en illimité, visite quotidienne, cycle jour/nuit régulier), avec anesthésie et traitement de la douleur lors de la chirurgie. De plus, cette chirurgie est réalisée par du personnel formé et sensible aux règles d'éthique expérimentale. Réduction : le nombre d'animaux a été réduit à la plus petite quantité possible après l'application des formules statistiques pour obtenir des résultats significatifs. Remplacement : l'imagerie des cellules pancréatiques ne peut se faire sans l'utilisation d'animaux vivants.

7539 Le diabète représente un enjeu mondial de Santé Publique (environ 200 millions de personnes dans le monde), sa prévalence devrait doubler d'ici 20 ans.

Le diabète de type 2 (DT2) est souvent associé à l'obésité représente plus de 90 % des patients diabétiques.

Les formes monogéniques (une seul gène responsable) du diabète incriminent des gènes responsables du trouble primitif de la sécrétion d'insuline et rendent les patients hyper glycémiques.

La thérapie génique, qui consiste à remplacer le manque de fonctionnalité par un transfert de gène, offre une dimension thérapeutique nouvelle.

La faisabilité et l'efficacité de ce transfert de gènes aux cellules pancréatiques humaines utilisera un vecteur viral. La transfection du gène sera réalisée par perfusion *ex vivo* de pancréas humain prélevé dans le cadre du prélèvement multiorganes sur donneur en état de mort cérébrale.

Les cellules modifiées génétiquement (îlots de Langerhans) seront isolées puis transplantées chez un modèle de souris immunodéficiente.

Après 6 à 12 semaines de surveillance les souris seront sacrifiées, les greffons explantés et l'évaluation de la biodistribution de la transfection du transgène sera faite par méthode histologique.

Pour cette étude, nous étudierons 7 pancréas humains pour chacun desquels 9 souris seront transplantées. De ce fait, nous utiliserons 63 souris Swis Nude immunodéprimées.

Afin de respecter les "3R", nous réduirons au maximum le nombre d'animaux afin que cela soit significativement probant. En parallèle, des études menées sur les mêmes cellules en culture

permettront d'obtenir certaines réponses, toutefois le recours à l'animal sera nécessaire pour connaître les effets physiologiques.

Enfin, en matière de raffinement, les animaux seront hébergés dans des conditions idéales (respect des rythmes circadiens, nourriture, eau ad libitum) et pris en charge par du personnel formé et compétent.

7540 *Escherichia coli* est une bactérie retrouvée dans le tractus digestif des mammifères. Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés qui leur confèrent un pouvoir virulent et sont donc à l'origine d'infections intestinale ou extra-intestinale chez l'homme. A ce jour, la prise en charge des patients s'effectue par des traitements symptomatiques ainsi qu'une antibiothérapie quand cela est possible.

Comme modèle de bactérie nous avons sélectionné *Citrobacter rodentium* car cette bactérie est un pathogène murin uniquement et n'est pas dangereuse pour l'homme, mais son processus infectieux est identique à celui des *E. coli* pathogènes (EPEC et EHEC). Dans le cadre d'un projet visant à caractériser de nouveaux facteurs de virulence des entérobactéries, des travaux ont identifié des gènes potentiellement impliqués dans le processus infectieux du pathogène. L'objectif est désormais de valider leur implication *in vivo* en utilisant un modèle animal. Ces expérimentations seront réalisées en utilisant des modèles murins décrits dans la littérature et en condition de confinement conventionnel puisque cette bactérie est en classe 1 des micro-organismes pathogènes (non pathogène pour l'Homme). Pour l'ensemble de ces expériences, la règle des 3R sera respectée. Réduire : seul le nombre minimal d'animaux seront utilisés, c'est à dire que nous testerons les différents gènes les uns après les autres suivant l'importance du phénotype qu'ils provoquent *in vitro*. Si les expériences sur les souris avec les mutants des gènes ayant les phénotypes les plus importants *in vitro* ne sont pas concluantes, l'expérimentation animale ne sera pas poursuivie. Nous utiliserons un maximum de 100 animaux pour une période de 48 mois, nous permettant de caractériser précisément l'importance des gènes d'intérêt identifiés sur la virulence ou le fitness de *Citrobacter rodentium*. Pour chacune de ces expériences, le nombre d'animaux sera réduit à son minimum tout en permettant néanmoins les analyses statistiques. Raffiner : les expériences se feront sur des souris qui ne sont pas sensibles au pathogène *C. rodentium*, c'est à dire que l'infection ne conduit pas à la mort de la souris. Les souris vont développer des colites qui ne sont pas douloureuses pour l'animal. Cependant, les animaux seront surveillés quotidiennement et euthanasiés selon les règles en vigueur s'ils présentent des modifications physiologiques et comportementales indiquant un mal-être. Remplacer : un maximum d'expérience se fera *in vitro*. A la fois sur *E. coli* et sur *C. rodentium*, en culture en milieu contrôlé. Un maximum des paramètres que les bactéries peuvent rencontrer dans l'hôte seront reproduit *in vitro*. Cependant l'aspect d'interaction avec l'hôte vivant ne peut pas être substitué pour l'ensemble des paramètres, car c'est l'hôte apporte des conditions multifactorielles et qui évoluent au cours du temps.

7541 La mutation du gène *Lsh/Hells* chez l'Homme est la cause du syndrome ICF de type 4 (Immunodeficiency, Centromeric Instability, Facial anomaly type 4), caractérisé par un déficit immunitaire associé à une instabilité chromosomique et des anomalies cranio-faciales. Les patients atteints de ce syndrome souffrent d'infections récurrentes et ne répondent pas aux vaccins. L'origine de ce déficit n'est pas connue pour le moment du fait de l'absence de modèle animal permettant de rechercher les cellules affectées par la perte de *Lsh*. Nous souhaitons aborder cette question en étudiant une lignée de souris mutantes pour *Lsh* récemment établie et non encore caractérisée.

Notre étude consistera à analyser les lymphocytes et la réponse anticorps contre des vaccins de 82 souris, comprenant des animaux portant des allèles modifiés de *Lsh* et des contrôles. Ce nombre d'animaux sera suffisant pour étudier la présence des différentes populations lymphocytaires ainsi que la réponse humorale, en tenant compte des variabilités interindividuelles naturellement observées pour ces processus.

Les études *in vitro* ne peuvent se substituer à l'étude projetée, dans la mesure où l'étude du développement lymphocytaire B et de la réponse immunitaire ne peut être abordée que par l'expérimentation *in vivo* chez les Vertébrés. La souris constitue en l'occurrence le modèle de référence pour l'étude de la réponse anticorps et de la mémoire immunitaire. Les animaux seront

élevés dans un environnement enrichi (maisonnettes en carton et/ou tubes en carton) et nous respecterons des points limites humains définis par l'aspect (ouverture des yeux, pelage) et le comportement (locomotion) des animaux subissant les différentes procédures. L'injection rétro-orbitaire sera effectuée sous anesthésie, suivant différents protocoles selon le nombre d'animaux à traiter. L'immunisation par voie-intrapéritonéale et le prélèvement par lancette n'engendrent normalement pas de douleur aiguë élevée ou chronique. Nous observerons quotidiennement les souris pendant les trois jours suivant l'immunisation, même si le protocole n'est pas censé générer de douleur particulière. Nous rechercherons en particulier des signes comportementaux (réduction de la mobilité, tremblement, paralysie, prostration) et vérifierons l'aspect général (poil ébouriffé, perte excessive de poils, dos voûté). En cas de dépassement de ces points limites, nous procéderons à une euthanasie anticipée. Concernant le raffinement des expériences, nous veillerons à l'enrichissement de l'environnement des animaux : boule de coton, maisonnettes en carton/et ou tube en carton.

7542 La calcification vasculaire (CV) est un processus de dégénérescence qui compromet l'intégrité des vaisseaux et augmente le risque de mortalité par accident cardiovasculaire. Elle se caractérise par l'accumulation pathologique de cristaux de calcium et phosphate sous la forme d'hydroxyapatite dans la matrice extracellulaire des parois artérielles. En fonction de leur site de développement, deux types de CV sont définies : les calcifications intimes, qui accompagnent la formation de la plaque athéromateuse et sont responsables d'accidents ischémiques coronariens, et les calcifications médiales qui se développent de façon linéaire le long des lames élastiques. Ces dernières augmentent la rigidité vasculaire et sont à l'origine de désordres hémodynamiques caractérisés par une augmentation de la vitesse de l'onde de pouls, une hypertrophie ventriculaire gauche, des anomalies de la perfusion coronarienne et une insuffisance cardiaque. Les patients atteints d'insuffisance rénale chronique (IRC) présentent un risque jusqu'à 5 fois plus élevé de développer des calcifications médiales. Ce risque est corrélé à une augmentation du risque d'accident cardiovasculaire. Le présent projet vise à mettre en place un modèle murin de calcifications médiales induites par l'IRC

Pour ce faire, nous reproduirons le "modèle adénine" sur des souris C57BL6J âgées de 16 semaines. Les souris seront réparties en 2 groupes : un groupe contrôle (n=60) et un groupe adénine (n=100). Les souris du groupe adénine suivront un régime enrichi avec 0.45% d'adénine (pour induire l'insuffisance rénale chronique) et 2% de phosphate (nécessaire au développement des calcifications), et subiront 3 injections par semaine de calcitriol (1 µg/Kg, connu pour amplifier les effets pro-calcifiants du phosphate). Les souris contrôles seront nourries avec l'aliment standard non supplémenté et ne recevront pas l'injection de calcitriol. Des mesures de pressions artérielles seront réalisées au moment des euthanasies afin de caractériser les effets hémodynamiques liés à la présence de calcifications médiales induites par l'IRC. Les aortes et les valves cardiaques des souris seront extraites au moment de l'euthanasie afin de vérifier leur degré de calcification ainsi que le profil d'expression des marqueurs géniques de calcification. Une moitié de l'effectif sera euthanasié après 2 mois d'exposition au régime, la seconde partie de l'effectif sera euthanasiée après 4 mois de régime. Ceci permettra d'évaluer le lien existant entre le temps d'exposition au régime adénine et le degré de calcification.

La complexité des aspects hémodynamiques et des mécanismes physiopathologiques impliqués dans le développement des calcifications médiales liées à l'IRC ne pouvant être reproduite *in vitro* ou *in silico*, ces expériences ne peuvent à l'heure actuelle être réalisées que par l'intermédiaire de modèles animaux. Notre choix s'est porté sur le modèle de souris adénine qui est actuellement une référence pour l'étude des calcifications médiales. Ce modèle a fait l'objet de plusieurs publications internationales et est reconnu par la communauté scientifique.

Le nombre d'animaux nécessaire à l'étude (n=160) est maintenu au minimum pour permettre une analyse statistique pertinente des résultats et éviter une impossibilité de conclure sur la validité du modèle par manque d'animaux dans des groupes expérimentaux.

L'état général des souris sera surveillé durant toute la durée du protocole par recherche quotidienne de signes cliniques indicateurs de souffrance et réalisation de pesées trois fois par semaine. Un système de score, basé sur l'étude des poids et des signes cliniques, a été mis en place afin d'évaluer

précocement toute détresse, douleur ou souffrance auxquelles l'animal pourrait être confronté. Les animaux seront euthanasiés si le point limite établi est atteint en cours de protocole.

7543 Le développement du cancer colorectal est étroitement lié au régime alimentaire et au mode de vie. La spécificité de ce cancer est qu'il se développe dans un organe au contact de deux déterminants majeurs de la physiologie intestinale : les nutriments et le microbiote intestinal. Le cancer colorectal est étroitement lié à de mauvaises habitudes alimentaires, telles qu'une alimentation riche en viandes rouges ou en graisses. La composition du microbiote est fortement influencée par la composition alimentaire. De nombreuses études suggèrent que des molécules produites par le microbiote bactérien peuvent influencer la formation de tumeurs, reliant le microbiote au cancer colorectal. D'autre part, des études récentes ont permis la découverte de nouveaux suppresseurs de tumeur qui induisent la survie de la cellule en présence de leur ligand. L'objectif de cette étude est de corréliser une modification du microbiote intestinal induite par des régimes riches en graisses au développement de tumeurs intestinales. Il s'agira notamment de nourrir des souris modifiées génétiquement pour les gènes impliquées dans la voie de suppression des tumeurs avec des régimes riches en graisses de provenance différente (saindoux ou huile de poisson) et étudier le développement de tumeurs, ou la résistance à la tumorigenèse. Cette étude ouvre donc la porte à une meilleure compréhension des mécanismes de formation de tumeurs dans l'intestin. Cette étude implique une réponse intégrée au niveau de l'organisme (interactions nutrition/microbiote), ce qui justifie une étude chez l'animal. Il s'agit d'une étude sur 480 souris portant sur 5 ans, en raison de la longueur des périodes d'adaptation au régime, et du grand nombre de génotypes impliqués. Le projet a été conçu pour respecter la règle des 3R : raffiner, réduire, remplacer. En effet, cette étude implique une réponse intégrée de l'organisme à l'ingestion de divers régimes alimentaires, ce qui nécessite une étude chez l'animal. Le nombre d'animaux et de groupes a été réduit au maximum sans toutefois mettre en péril une interprétation statistique des résultats. De plus, le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de la procédure, et la douleur légère sera traitée par un antalgique (paracétamol). En cas de signes de souffrance ou angoisse sévères des souris au cours des procédures, les souris seront euthanasiées.

7544 Ce projet consiste à tester une nouvelle approche de contrôle du développement de tumeur chez la souris. Pour cela, 120 souris de la lignée CB57Bl/6 seront utilisées afin d'établir l'efficacité de l'utilisation d'un composé X sur le développement d'une tumeur.

Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 120 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Une approche *in vitro* a été développée en amont afin de valider notre hypothèse de travail et l'utilisation du composé X sur des cellules immunitaires impliquées dans le contrôle de la tumeur mais cela ne reproduit pas un modèle de régulation complexe permettant la validation de notre stratégie.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience des différents partenaires de ce projet.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Du paracétamol sera délivré via l'eau de boisson dès J0 et jusqu'à la fin de l'expérimentation, Les souris sont suivies quotidiennement durant les 3 semaines qui suivent l'inoculation des tachyzoïtes *Toxoplasma gondii*. Certains signes cliniques comme l'asthénie, la pilo-érection, une perte de poids sont prédictifs d'une infection importante et conduiront à l'euthanasie des animaux sans délai afin de leur éviter toute souffrance.

7545 Un cancer (ou tumeur maligne) est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme, qui compromet la survie de ce dernier. Toutes ces cellules dérivent d'une cellule initiatrice du cancer qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases.

Chaque année, à travers le monde environ 14 millions de cancers sont diagnostiqués responsables de plus de 8 millions de décès. En France, ce sont 385 000 cancers diagnostiqués chaque année, le cancer représentant la première cause de mortalité chez les hommes et la seconde chez les femmes.

L'approche pour le traitement du cancer a profondément évolué ces dernières années. La chirurgie et la radiothérapie pour des cancers très localisés, la chimiothérapie pour des cancers plus diffus et les thérapies ciblées pour des cancers ayant des mutations génétiques particulières en étaient la pierre angulaire.

L'immuno-oncologie représente aujourd'hui une nouvelle approche thérapeutique. Sa particularité n'est pas de cibler directement la tumeur comme les autres stratégies thérapeutiques, mais d'aider à restaurer le bon fonctionnement du système immunitaire pour lui permettre de défendre l'organisme en reconnaissant et détruisant les cellules tumorales.

L'immuno-oncologie représente une avancée majeure dans le traitement du cancer. Son application concrète remonte au début des années 2010. Les preuves cliniques de son efficacité démontrent son potentiel dans le traitement de certains cancers à un stade avancé.

Pour les tumeurs pour lesquelles la prise en charge est complexe et les possibilités thérapeutiques limitées, le besoin médical en traitements innovants et efficaces est considérable. Cette voie de traitement ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques, avec le potentiel d'offrir à certains patients une chance de survie prolongée et une meilleure qualité de vie.

L'immuno-oncologie est aujourd'hui en plein essor. Le blocage des « points de contrôle » immunitaires est la voie plus avancée mais d'autres stratégies sont également à l'étude. En l'occurrence, ce peut être le cas d'anticorps bi-spécifiques qui vont par l'intermédiaire d'un bras, lier une cellule tumorale et d'un autre bras, engager une cellule effectrice du système immunitaire pour favoriser l'élimination de la cellule tumorale.

Le blinatumomab, un médicament aujourd'hui utilisé dans le traitement de la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), en est un exemple. Il s'agit d'un anticorps bi-spécifique engageant les lymphocytes T (BI-specific T cell Engager). Il se lie sélectivement au CD3 exprimé à la surface des lymphocytes T et au CD19 exprimé à la surface des cellules de lignée B malignes. Il induit la formation d'une synapse cytolytique entre le lymphocyte T et la cellule tumorale, entraînant la libération d'enzymes protéolytiques pour tuer les cellules cibles.

Notre laboratoire, fort de son expertise sur les cellules NK, travaille actuellement sur le développement d'un anticorps thérapeutique équivalent, engageant non pas les lymphocytes T mais les cellules NK, cellules clés de l'immunité anti-tumorale (BI-specific NK Engager). En effet, l'engagement des cellules T montre certains effets secondaires indésirables, en l'occurrence une toxicité apparente liée au relargage de certaines molécules (cytokines) propres aux cellules T.

Le présent projet consiste à évaluer l'efficacité d'anticorps 'BI-specific NK Engager' qui favoriseraient la mobilisation de cellules effectrices du système immunitaire, les cellules NK, envers les cellules tumorales. Après sélection des meilleurs anticorps dans des tests fonctionnels *in vitro*, des tests seront effectués sur des modèles animaux aussi prédictifs que possible : des modèles de tumeurs liquides ou solides, syngéniques (greffe de cellules tumorales de souris dans des souris immuno-compétentes) ou xénogéniques (greffe de cellules tumorales humaines dans des souris en partie immuno-déficientes). L'intérêt des modèles syngéniques sera de tester un anticorps 'surrogate' (substitut du candidat médicament chez la souris) en présence d'un système immunitaire complet, compétent. L'intérêt des modèles xénogéniques sera de tester le candidat médicament sur des cellules tumorales humaines.

Le nombre d'animaux inclus dans ce projet a été déterminé par un calcul de N : 60 par série expérimentale pour un total de 100 séries sur 5 ans, soit 6000 animaux. Les points limites ont quant à eux été fixés sur la base de la grille d'évaluation de la souffrance de MORTON et GRIFFITHS 1985 modifiée. Elle inclut notamment des éléments relatifs à l'apparence des animaux, leur examen clinique, leur comportement et la possible perte de poids supérieure à 20%.

Évaluer des stratégies thérapeutiques visant à réactiver l'immunité implique d'être dans un système biologique complexe qui rassemble tumeur, environnement tumoral et système immunitaire. Compte tenu de l'interaction étroite entre ces différents systèmes, qu'il n'est pas possible de reproduire *in vitro*,

il est nécessaire d'obtenir des preuves de concept sur animal entier dans le processus de développement de candidats médicaments.

7546 L'atrophie multisystématisée (AMS) est une maladie neurodégénérative rare, d'évolution progressive et de mauvais pronostic. L'AMS se caractérise par la présence d'inclusions dans le cytoplasme de cellules gliales (non neuronales) résultant de l'accumulation d'une protéine normalement présente dans le cerveau, l'alpha-synucléine, dont le métabolisme est altéré par des mécanismes encore inconnus.

Un modèle de souris reproduit les anomalies biochimiques et neurologiques de la maladie humaine. Cet animal a été partiellement caractérisé et il n'y a pas d'étude montrant qu'il présente une atteinte du système nerveux autonome (SNA) similaire à celle de l'Homme. Ce point est majeur pour valider ce modèle comme utile pour comprendre les mécanismes moléculaires de l'AMS mais aussi son utilisation pour la recherche de traitements efficaces susceptibles de modifier l'évolution naturelle de la maladie ou de corriger les troubles neurologiques ou de l'activité du SNA.

Parmi les réflexes impliquant le SNA, le baroréflexe est particulièrement important car il permet l'ajustement fin et continu de la pression sanguine artérielle (PSA) et de la fréquence cardiaque (FC). La perturbation du baroréflexe rend probablement compte des troubles sévères de la régulation de la PSA dans l'AMS.

Nous souhaitons donc étudier dans un modèle de souris transgénique surexprimant la protéine alpha-synucléine dans le cerveau comme dans l'AMS, l'activité du SNA et plus particulièrement le fonctionnement du baroréflexe et l'activité du système nerveux sympathique rénal. Dans un 1er temps, 40 animaux (20 souris Wild Type (WT) et 20 souris transgéniques AMS) seront utilisées pour l'évaluation du baroréflexe et cela nécessitera l'enregistrement des de la FC par ECG et de la PSA au niveau de l'artère carotide. Une 2ème série de souris (même nombre d'animaux que la 1ère série) sera utilisée pour mesurer l'activité des fibres sympathiques rénales par microneurographie (RSNA).

Ce travail permettra de compléter la caractérisation du modèle de souris AMS. A terme, il permettra aussi de mieux comprendre les mécanismes des perturbations du fonctionnement du SNA chez les patients et donc d'envisager une approche thérapeutique plus rationnelle.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- Raffiner : L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux, adaptée à l'expérience et à de potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global.
- Réduire : L'expérience a été organisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. 80 animaux seront nécessaires pour la totalité de l'expérimentation.
- Remplacer : Il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs pour l'évaluation du SNS lors d'une situation d'AMS.

7547 La France compte environ 700 000 cas de cirrhoses par an, entraînant entre 10 000 et 15 000 décès. A l'échelle mondiale, le nombre de morts par an s'élève à plus d'un million. Les causes principales en sont la consommation excessive d'alcool (notamment en France) et les hépatites chroniques virales. La greffe de foie est actuellement le seul traitement possible face à une cirrhose. Elle représente 1000 opérations par an en France.

L'adénosine est considérée comme un médicament potentiel pour le traitement des cirrhoses. Cependant, son utilisation clinique est extrêmement limitée car, si cette molécule est injectée par voie intraveineuse, elle est dégradée en quelques secondes dans la circulation sanguine. Ce problème peut être résolu grâce au concept de « squalénisation ». Ce concept consiste à protéger l'adénosine en la couplant à un dérivé lipidique naturel, le squalène, qui est un précurseur du cholestérol. On forme alors des nanoparticules (NPs), qui, une fois administrées par voie intraveineuse, relarguent progressivement l'adénosine dans l'organisme.

Récemment, il a été montré que les NPs d'adénosine squalène (AdSQ) permettaient de soigner des lésions d'ischémie cérébrale (AVC) chez la souris et, à l'occasion de cette étude, il a été observé une accumulation des NPs d'AdSQ dans le foie. Ces résultats amènent à penser que les NPs d'AdSQ

pourraient avoir une action protectrice, voire régénératrice, sur le foie par l'apport de fortes doses d'adénosine localement.

Ainsi, le but de cette étude est d'évaluer l'activité des NPs d'AdSQ sur le système hépatique, plus précisément l'action protectrice de cette molécule sur le foie à des étapes plus ou moins avancées de cirrhose.

La cirrhose sera induite chez des souris adultes par injections répétées d'une substance toxique pour le foie. Ce modèle est connu et bien décrit dans la littérature. C'est un modèle de cirrhose compensée qui n'entraîne ni symptôme, ni douleur. La cirrhose hépatique résulte d'interactions entre les différents types cellulaires présents dans le foie. Seul le recours à l'animal nous permettra de prendre en compte ce microenvironnement complexe qui implique de nombreux processus, notamment inflammatoires. De plus, les NPs d'AdSQ sont potentiellement modifiées pendant leur transport. Une étude *in vivo* permettra de reproduire l'interaction des nanomédicaments avec les composants du sang, leur passage de la circulation sanguine vers les organes et ainsi d'évaluer leur efficacité thérapeutique.

Une planification statistique minutieuse permettra de réduire le nombre d'animaux tout en préservant la validité de l'étude. Le nombre d'animaux total utilisé pour ce projet est de 400 souris.

Au cours de chaque procédure, on comparera les effets des NPs d'AdSQ avec ceux des NPs de squalène vide (non lié à l'adénosine), de l'adénosine libre (non liée au squalène) et d'un placebo. Les différentes procédures permettront d'évaluer ces effets sur un foie de plus en plus endommagé (intoxication aigue, fibrose légère, fibrose sévère, cirrhose compensée).

Le bien-être des animaux (raffinement) sera également pris en compte. Les souris seront hébergées en groupe dans un environnement enrichi, favorisant l'activité et réduisant le stress. L'état général des souris sera contrôlé tous les jours et des actions de lutte contre la douleur ou l'inconfort seront mis en place le cas échéant. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces, seront déterminés.

7548 La fréquence et le rythme cardiaque sont des facteurs très importants pour la qualité de la vie et la santé humaine. Définies comme des dysfonctions du rythme cardiaque, les arythmies sont des maladies très répandues avec des degrés de sévérité et gravité très variable, pouvant aller jusqu'à la mort subite. Parmi les arythmies les plus répandues, nous trouvons la bradycardie. Cette pathologie se caractérise par une fréquence cardiaque trop basse (avec risque de syncope) pour répondre à la nécessité physiologique de l'organisme notamment face à l'effort. Un état de fatigue chronique, des vertiges et des palpitations sont les symptômes invalidants de la bradycardie. Elle est plus répandue chez la population âgée, mais peut aussi affecter des jeunes individus. La seule thérapie actuellement disponible consiste en la pose irréversible d'un pacemaker électronique. Cette thérapie présente de nombreux inconvénients avec l'augmentation massive du nombre de patients traités, notamment à cause du vieillissement de la population. Ces inconvénients sont notamment une implantation irréversible, des coûts importants et une amélioration de la qualité mais pas de l'espérance de vie. Dans un avenir proche, il sera donc de plus en plus important de disposer des nouvelles stratégies thérapeutiques, tout particulièrement, des thérapies cellulaires basées sur les cellules souches et des thérapies pharmacologiques. L'objectif étant d'améliorer la fréquence cardiaque et de retarder voir remplacer les pacemakers électroniques.

Notre projet vise à mieux comprendre le rôle physiologique de 4 gènes codant pour des canaux ioniques impliqués dans la genèse et la régulation de la fréquence cardiaque. Ces 4 canaux ioniques sont à l'origine de la rythmicité et contrôlent négativement la fréquence cardiaque sous l'action du nerf vague. Ils sont donc des candidats intéressants pour évaluer leurs intérêts en tant que nouvelles cibles thérapeutiques dans la prise en charge de la bradycardie. Ils pourraient même être à la base du développement de nouveaux pacemakers dits « biologiques » basés sur les cellules souches.

En utilisant des modèles de souris génétiquement modifiées pour différentes combinaisons de ces 4 canaux (17 lignées différentes), nous allons étudier la génération et la régulation de fréquence cardiaque. Cette étude se fera par l'enregistrement d'électrocardiogramme à l'aide de la télémetrie sur ces souris après différents traitements pharmacologiques connus pour réguler la fréquence et le rythme cardiaque.

Pour ce projet nous utiliserons 408 souris au total et nous appliquerons la règle des 3R notamment de la façon suivante :

Remplacement : La fréquence et les arythmies cardiaques sont des phénomènes complexes résultant des interactions entre les cardiomyocytes, dont l'activité électrique est normale ou altérée, les fibroblastes cardiaques (70% des cellules cardiaques) et le système nerveux autonome. Ce niveau d'intégration ne peut être obtenu que sur un modèle animal complexe. Dans le choix de ce modèle animal, la souris permet de répondre au mieux à nos questions sans avoir recours à des modèles plus proche de l'homme. Ainsi sans appliquer strictement la règle de remplacement nous avons choisis un modèle le plus acceptable pour nous apporter des résultats exploitables et transposables chez l'homme.

Réduction : Pour avoir une mesure fiable et statistiquement significative du paramètre de fréquence cardiaque, le nombre minimum d'animaux par lignée a été déterminé en se basant sur notre expérience, sur des analyses statistiques et sur les données bibliographiques. De plus, nous utiliserons à la fois les mâles et les femelles ce qui permet d'exploiter l'ensemble des animaux produits et la télémétrie permet que chaque souris utilisée est son propre contrôle statistique. Une rationalisation sur la production des génotypes nécessaires sera une partie importante de nos schémas d'accouplements pour la production de nos lots.

Raffinement. Toutes les lignées de souris que nous utiliserons ne présentent aucun signe de douleur dans nos conditions d'élevage (cages avec enrichissement selon la réglementation et notre SBEA). Afin d'étudier la fréquence cardiaque, nous avons choisi d'utiliser la télémétrie. Cette technique est simple à mettre en place et peu invasive ce qui n'interfère pas avec le comportement et réduit drastiquement la manipulation de l'animal. La chirurgie nécessaire pour l'enregistrement télémétrique de l'électrocardiogramme sera réalisée sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque étape avant, pendant et après la chirurgie. De plus les animaux ayant des implants seront hébergés avec d'autres souris non implantées (pour éviter toute interférence) ce qui permet de ne pas les isoler et ainsi réduire leur stress.

7549 Du fait de l'incapacité du système nerveux central (SNC) à s'auto-réparer, les traumatismes du SNC sont dévastateurs. La transplantation neuronale a été explorée comme une approche potentielle permettant de rétablir les fonctions cérébrales en remplaçant les neurones perdus par de nouveaux neurones. Nous avons préalablement démontré que des neurones transplantés issus de cellules fœtales murines greffés immédiatement après la lésion du cortex de souris adultes pouvaient efficacement rétablir des connexions spécifiques indiquant que la réparation cellulaire du cortex et des projections corticales était possible chez la souris. De plus, nous avons montré que quand la transplantation est effectuée une semaine après la lésion corticale son effet bénéfique est plus important. L'objectif de ce projet est de comprendre pour quelles raisons la transplantation marche mieux quand elle est effectuée une semaine après la lésion en comparaison avec la transplantation immédiatement après la lésion. Nous nous intéressons notamment aux processus inflammatoires et plus particulièrement à l'IL-33, une cytokine impliquée dans l'immunité innée. Pour cela, nous proposons de réaliser des greffes dans un modèle de souris transgéniques : les souris KO pour IL-33, afin d'étudier le rôle de cette molécule dans le développement des neurones greffes. Dans ce même modèle, nous souhaiterions comparer et tester l'efficacité d'une source alternative de cellules dans ce modèle de souris transgénique : les cellules souches pluripotentes induites humaines différenciées en précurseurs neuronaux corticaux. L'intérêt thérapeutique de ces cellules est leur capacité à se multiplier à l'infini *in vitro* et d'éliminer tous les risques de rejets chez les patients.

Notre protocole nécessite la formation de 4 groupes de souris composés chacun de 10 animaux (contrôles, souris lésées transplantées ou non, avec ou sans délai entre la lésion et la greffe). Afin de réaliser une étude des différents paramètres (inflammation, vascularisation, croissance du greffon...) ces groupes seront répétés pour étudier l'évolution de la greffe par différentes techniques : études comportementales, imagerie cérébrale, cytométrie en flux ou études histologiques, soit $40 \times 3 = 120$ animaux. De plus, ce protocole devra être répété 4 fois pour pouvoir réaliser la lésion corticale avec deux modèles expérimentaux différents mais complémentaires, et pour réaliser les greffes avec les deux différentes sources de cellules (embryonnaires ou cultivées *in vitro*). Cela représente donc un nombre de 120×4 soit 480 animaux pour un protocole complet. La règle des 3R a été prise en

considération. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

7550 Le projet a pour but d'étudier la dissémination d'un vecteur viral, destiné à la vaccination, au niveau de l'organisme en fonction du mode d'injection.

Pour cela, des vecteurs fluorescents seront injectés à l'animal par différentes voies puis localisés par microscopie dans l'animal vivant. Ainsi, suite à nos observations nous pourrions en déduire le mode d'administration optimal de notre vecteur viral d'intérêt. L'utilisation d'animaux est nécessaire pour ce projet car nous voulons observer l'évolution *in vivo* du virus utilisé comme vecteur vaccinal. L'un des buts de notre étude est de décrire la propagation tissulaire et au niveau des organes lymphoïdes secondaires du virus. Lors de l'acquisition des images, les animaux seront anesthésiés afin de s'affranchir de tout mouvement et éviter une contention sur animal vigile. La microscopie par fluorescence est une technique très puissante permettant d'obtenir une image de grande résolution au sein d'un animal. L'intérêt de cette technique est de pouvoir observer chez un même animal à différents temps la propagation du virus. Cela permet une réduction importante du nombre d'animaux utilisés pour répondre à la question scientifique. Cette expérience sera donc en accord avec la règle des 3Rs. Les animaux utilisés pour cette expérience seront des souris possédant des propriétés génétiques particulières permettant de leur conférer une sensibilité au virus, qui normalement ne touche pas leur espèce. Au cours des trois années de cette étude, 408 animaux seront utilisés pour subir des procédures légères à moyennes.

7551 Le but de cette étude est de caractériser des biomarqueurs à utiliser dans le traitement de l'achondroplasie, qui est la forme de nanisme la plus fréquente, afin de l'amener jusqu'en phase clinique. Ceci se place dans la continuité d'un projet précédent. Cette maladie est due à une modification dans le gène FGFR3 qui résulte en son activation prolongée. Cette activation aberrante de FGFR3 est directement responsable de l'arrêt de la croissance osseuse. Il a été montré dans une étude précédente que nous avons trouvé un traitement pour ce nanisme.

Nous disposons de souris malades qui présentent la même maladie que les patients. Ce projet nécessite l'utilisation de ces animaux afin de déterminer des biomarqueurs et ensuite transposer leur utilisation dans d'autres modèles et ainsi continuer le développement pharmacologique de la molécule.

Ce projet aura des bénéfices pour l'homme sur plusieurs niveaux. D'une part, à l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement pour l'achondroplasie permettant de restaurer une croissance osseuse et donc de permettre aux patients de grandir mais surtout d'éliminer les complications et notamment les paralysies de la moelle épinière. Nos résultats préliminaires sont très encourageants et suggèrent que notre traitement pourra éventuellement être utilisé en clinique. Le but de cette étude est d'apporter la preuve de concept clinique de l'utilisation de biomarqueur pour le suivi d'efficacité du traitement. Les projets précédents nous ont permis de choisir la molécule qui va être utilisée dans les essais cliniques.

Afin de satisfaire avec les exigences de la règle des 3R nous avons déjà mis en place différentes stratégies. Tout d'abord dans un but de remplacement nous avons déjà réalisé un screening *in vitro* des molécules à tester afin de ne tester *in vivo* que la molécule présentant un potentiel thérapeutique élevé, basé sur la comparaison avec l'étude précédente que nous avons réalisée et qui a démontré une efficacité chez l'animal. Dans un but de réduction nous avons estimé le nombre d'animaux strictement nécessaire fondé sur un calcul de puissance statistique et basé sur notre expérience des résultats précédents. Enfin dans un but de raffinement des expériences nous réalisons une évaluation précise de l'état des animaux au cours des procédures grâce à des grilles de suivi et l'établissement de points limites précoces. Nous estimons que nous allons utiliser au maximum 7000 souris soit 1800 souris dans la procédure 1, 2600 souris dans la procédure 2, 2600 souris dans la procédure 3.

7552 *Escherichia coli* est une bactérie qui colonise le tube digestif de l'Homme et des animaux à sang chaud, dès les premières heures qui suivent la naissance. Un sous-groupe d'*E. coli* est responsable de maladies telles que les méningites néonatales, les septicémies et les infections urinaires. Ces bactéries se distinguent des autres *E. coli* car elles portent sur leur chromosome une région d'ADN, appelée *ilot pks*.

On sait aujourd'hui qu'une multiplicité de molécules à activités biologiques différentes sont synthétisés à partir de l'*ilot pks*. Leur rôle précis dans l'implantation de la bactérie dans l'intestin est inconnu. Nous testerons dans un modèle murin de transmission bactérienne verticale de la mère à l'enfant (où les bactéries sont inoculées à la mère gestante et transmises aux nouveaux nés au moment de la mise bas), l'influence de ces différentes molécules sur l'établissement de la colonisation du tube digestif du souriceau par ces *E. coli*.

Au total, 600 souris reproductrices (120 mâles et 480 femelles) seront nécessaires, sur une période de 5 ans pour la complétion de ce projet. 5760 souriceaux approximativement devraient pouvoir ainsi être analysés. Soit au total 6360 animaux. Pour ce projet, il faut combiner la variable « souche bactérienne » (commensale, pathogène) et la variable « répertoire de molécules produites (via l'utilisation de divers mutants de l'*ilot pks*) ».

Aucune expérimentation alternative ne peut remplacer l'aspect *in vivo* de ce projet dont le but est d'étudier l'impact de molécules produites par *E. coli* sur l'établissement de la colonisation intestinale chez les nouveau-nés. Par ailleurs, ce modèle de transmission verticale de *E. coli* depuis la mère vers les souriceaux permet de mimer le véritable mode de transmission de la bactérie vers la descendance. Tous les moyens seront mis en œuvre pour respecter les règles des 3R. Le projet a été élaboré de façon à réduire au maximum le nombre de souris requises. Nous travaillerons notamment avec des souris Swiss qui, au contraire d'autres lignées de souris, donnent des portées comprenant un grand nombre de souriceaux, approximativement 12 en moyenne. Ceci permettra de réduire le nombre d'animaux reproducteurs requis, et d'obtenir une descendance nombreuse afin de réaliser des analyses statistiques robustes. Le bien-être de l'animal sera en permanence au centre de nos préoccupations. Les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies *ad libitum*. Le change de la litière est réalisé 2 fois par mois. Du coton ou du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentations font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement. La procédure expérimentale, basée sur un gavage oral des souris avec une suspension bactérienne, n'implique aucune douleur. Le gavage oral des souris par des *E. coli* commensales et pathogènes n'occasionne qu'extrêmement rarement une réponse délétère pour l'animal. Tout animal présentant des signes de douleur, souffrance ou angoisse sera euthanasié.

7553 La trisomie 21 (ou syndrome de Down) est l'anomalie chromosomique la plus fréquente chez l'homme; Cette erreur de répartition du patrimoine génétique conduit à une surexpression des gènes du chromosome 21 humain (Hsa21), perturbant de nombreux systèmes physiologiques, morphologiques et biochimiques. Ces dérégulations se font de manière directe via l'augmentation de la production de protéines du Hsa21, ou indirecte à travers une multitude d'interactions de ces protéines sur l'ensemble du génome. Des modèles murins ont été générés dans le but d'étudier le rôle des différentes régions du Hsa21 impliquées dans les différents symptômes des personnes porteuses de la trisomie 21. Un de ces modèles, la lignée Ts1Yah, présente des altérations de mémoire dans des tests de performance cognitive. Parmi les gènes candidats à ces déficits, le gène codant pour la protéine Cystathionine Beta Synthase (CBS) a été choisi comme gène à plus fort potentiel : des mutations de ce gène sont impliquées dans un retard mental plus ou moins sévère chez l'homme; les voies métaboliques associées à la CBS sont à l'origine de fonctions très importantes dans la cellule. Par des expériences d'effets de dose du gène CBS chez le modèle de souris Ts1Yah, il a été démontré que ce gène était impliqué dans la fonction de mémoire à court terme. Un second modèle surexprimant seul le gène de la CBS a décrit les mêmes déficits de mémoire et d'apprentissage que les souris Ts1Yah, confortant l'hypothèse du rôle prépondérant de la CBS. Le but de notre étude est de trouver des molécules potentiellement inhibitrices de cette protéine qui permettraient de réduire l'activité du surdosage de la CBS dans les tissus, et principalement dans le cerveau. Nous souhaitons,

par un traitement chronique, restaurer les performances des souris possédant 3 copies du gène Cbs. Nous avons 2 molécules (Le disulfiram, le clioquinol) dont les effets ont été prouvés par des expériences de croissance *in vitro* chez des modèles de levure transformées génétiquement (collaboration université de Brest). Ces molécules sont déjà sur le marché et sont préconisées dans le traitement de pathologies du cerveau (Alcoolisme, maladies neurodégénératives).

Nous ne pourrions pas remplacer l'utilisation de modèle animal; Il est nécessaire d'utiliser une espèce dotée d'un pouvoir de mémorisation cognitive dans notre projet. Nous testerons chacune des 2 molécules sur 2 lignées de souris référencées dans l'étude de la trisomie 21; nous utiliserons 2 cohortes de 60 animaux, pour chaque lignée de souris, et pour chaque dose de molécule testée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, la 2e cohorte d'animaux transgéniques ne sera générée que si la 1ere cohorte démontre une activité de mémorisation au cours des tests d'évaluation. Nous générerons donc potentiellement 960 animaux afin de couvrir l'ensemble de l'étude.

Enfin, en termes de raffinement, aucun dommage particulier n'est attendu pour ce projet. Néanmoins, les animaux feront l'objet d'un suivi quotidien et des points limites éthiques seront appliqués afin d'éviter tout stress ou souffrance.

7554 L'objectif de ce projet est de tester différents produits fournis par différents laboratoires pharmaceutiques ou biotechnologiques dans le but de réduire la douleur ou l'inconfort oculaire et de les sélectionner pour les tester ensuite dans des études cliniques.

Ce projet nécessite le recours à l'animal puisqu'à ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. Les espèces animales choisies ont une physiologie, une anatomie et un métabolisme permettant une extrapolation à l'homme des effets sur l'œil.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 21600 animaux (7200 rats, 7200 souris et 7200 lapins) sur 5 ans. Les animaux seront de jeunes adultes.

Les examens cliniques in-vivo et les administrations seront réalisés sur animal vigile nécessitant une légère contention douce.

L'ensemble de ces examens ainsi que les voies d'administrations (instillations) sont pratiqués couramment chez l'homme dans un cabinet d'ophtalmologie ou chez l'animal en ambulatoire et en clinique vétérinaire.

Ce projet comprendra 2 procédures expérimentales de courtes durées (procédure 1 : 1h ; procédure 2 : une journée). La douleur ou l'inconfort engendrés sont réversibles spontanément par un rinçage abondant avec une solution physiologique.

Afin de minimiser l'impact sur le bien-être des animaux, les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi adapté à l'espèce auront un suivi quotidien. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces seront mis en place.

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.

7555 La fièvre Q est une zoonose, due à une infection par une bactérie intracellulaire appelée *Coxiella burnetii*. Malgré le traitement, des rechutes sont rapportées après la primo-infection, notamment chez les personnes immunodéprimées, après les grossesses répétées, ou après traitements avec des rayons X ou à la cortisone. L'histoire naturelle de l'infection par *C. burnetii* montre que les bactéries persistent dans leurs hôtes pour des périodes prolongées; cette persistance a été documentée dans la moelle osseuse et le sang périphérique provenant de patients qui ont été cliniquement guéris de la fièvre Q. Cependant, seulement l'acide nucléique a été mis en évidence et pas la viabilité bactérienne.

Des travaux récents menés dans notre laboratoire ont montré que *C. burnetii*, persistait spécifiquement au niveau du tissu adipeux après guérison clinique, lorsque les bactéries étaient absentes dans d'autres organes, y compris le foie, les poumons, le cerveau et la rate. Ces bactéries persistantes au sein du tissu adipeux étaient vivantes.

L'objectif de notre projet est d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant l'infection du tissu adipeux en utilisant des souris obèses, ce qui nous amène à aborder le problème plus général du rôle du tissu adipeux comme réservoir à partir duquel les bactéries impliquées dans des maladies à rechute, peuvent être réactivées.

La complexité du tissu adipeux fait que son étude ne peut être envisagée en dehors d'un organisme entier et la souris apparaît comme le modèle le plus adapté aux types de recherches envisagées.

Pour cela, des souris sauvages rendues obèses (par un régime alimentaire spécifique) et des souris sauvages contrôles (régime alimentaire standard correspondant) seront infectées par *C. burnetii* via la voie aérienne (la voie naturelle d'infection). Pour le confort de l'animal, un enrichissement sera mis en place à l'aide des dômes et du matériel pour nidification. Afin de maximiser les données obtenues de chaque animal, plusieurs tissus seront prélevés (sang, foie, rate, cerveau, poumons, tissu adipeux et moelle osseuse). Nous étudierons dans un premier temps la spécificité de l'infection des souris obèses par comparaison aux souris contrôles. Nous nous intéresserons à la charge bactérienne et l'aspect histologique au niveau notamment du tissu adipeux ainsi qu'à la signature transcriptionnelle au sein de ce tissu. Puis dans un second temps nous nous intéresserons à l'effet d'une corticothérapie sur la réactivation de l'infection primaire.

Ce projet sera réalisé dans une enceinte de sécurité microbiologique de classe 3 (NSB3) et il nécessitera au total de 240 souris. Nous avons estimé que 20 souris (10 pour le groupe de souris sauvage et 10 pour le groupe de souris obèses) seront nécessaires pour avoir une puissance de 80% de détecter une différence minimale de 60% entre ces deux groupes lors de l'évaluation de la charge bactérienne notamment au niveau du tissu adipeux et du sang avec un risque alpha unilatéral de 5%, et en assumant un effet anticipé de 20% dans le groupe obèse. Le test non paramétrique de Mann-Whitney sera utilisé pour les analyses des différences en termes de répllication bactérienne et d'inflammation.

7556 L'objectif de ce travail est de revitaliser les dents partiellement dévitalisées par les chirurgiens-dentistes (pulpotomie) suite à une infection carieuse afin qu'elles puissent se défendre face aux nombreuses bactéries présentes dans la cavité buccale. En effet, le traitement actuel consiste simplement à remplacer la pulpe dentaire présente au centre de la dent par un matériau inerte. Les études ont montré que ce matériau manque souvent d'étanchéité, ce qui peut conduire à une nouvelle infection dentaire qui va nécessiter de refaire les traitements réalisés, voire même dans certains cas, d'extraire la dent.

Cet inconvénient souligne l'importance de trouver de nouvelles solutions thérapeutiques pour remplacer celle, insatisfaisante, utilisée actuellement.

Plusieurs approches de médecine régénérative à base de cellules souches ont récemment fait leurs preuves dans la réparation et le remplacement des tissus endommagés chez l'homme. De telles approches suscitent un grand intérêt en médecine bucco-dentaire car la régénération d'une pulpe dentaire vivante permettrait à la dent revitalisée et fonctionnelle de se défendre face à de futures agressions. Nous avons récemment identifié une nouvelle population de cellules souches dans la pulpe dentaire, que nous avons appelées DP-MSCs et dont les propriétés en termes de régénération tissulaire sont prometteuses. Nous avons parallèlement créé un protocole innovant pour isoler, amplifier et conserver ces cellules. Ces cellules seront associées à un hydrogel constitué de deux composants déjà utilisés en clinique humaine, la fibrine et le chitosane, qui sont ici associés selon une formulation originale. Il est injectable, cytocompatible, gélifie sur des temps courts, cliniquement pertinents, sans ajout d'agents chimiques potentiellement dangereux. Le comportement des DP-MSCs dans l'hydrogel est étudié parallèlement à notre étude, dans des cylindres de racine dentaire humaine implanter sous la peau dorsale de souris immunodéficientes dans lequel aura été injecté l'hydrogel contenant ou non, les cellules saines.

Notre objectif est à présent d'étudier le comportement de l'hydrogel contenant ou non les DP-MSCs lorsqu'il est injecté dans une dent au contact de la pulpe sectionnée. Pour cela, nous allons utiliser un modèle animal que nous avons mis au point récemment, l'incisive de rat, dans laquelle aura été injecté l'hydrogel contenant ou non les cellules. L'utilisation de l'incisive de rat permet en effet de suivre la

régénération pulpaire dans un environnement similaire à celui *in vivo* mais aussi d'étudier précisément la réponse immune.

Plusieurs jours après l'implantation chez le rat, les dents seront récupérées et analysées pour déterminer si les cellules qu'ils contiennent ont pu régénérer une pulpe dentaire similaire à celle d'origine.

Le nombre d'animaux nécessaires pour ce projet est de 128.

Remplacement : Aucune méthode alternative ne peut se substituer à l'utilisation des animaux. La complexité du système à étudier et son impossibilité à le reproduire *in vitro*, en tenant compte de tous les phénomènes biologiques de l'organisme (réponse du système immunitaire, vascularisation et innervation du tissu régénéré notamment), font qu'il n'y a aucune méthode alternative qui pourrait se substituer à l'utilisation des animaux.

Réduction : Pour chaque expérience, nous avons le souci permanent d'utiliser un nombre minimum d'animaux tout en ayant le maximum de chances d'obtenir des résultats satisfaisants et reproductibles.

Raffinement : Les animaux sont hébergés dans une animalerie avec un accès à l'eau et à la nourriture *ad libitum*. Un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. L'apparence physique, le comportement et la réponse à des stimuli externes seront observés quotidiennement. Les rats seront observés quotidiennement, incluant les week ends, pendant 1 semaine après l'implantation du biomatériau pour détecter l'éventuelle apparition de signes de souffrances (position prostrée, absence de nutrition, absence de réponse aux stimuli extérieurs, retard de croissance).

De plus pour le bien-être des animaux des produits d'enrichissements sont disposés dans la cage : rouleau carton + paper wool.

7557 Les anomalies précoces du développement cérébral sont la cause de maladies malformatives du cerveau plus ou moins sévères, et peuvent aussi avoir des conséquences pathologiques à long terme, telles qu'épilepsie, autisme, etc. Ces anomalies peuvent avoir des causes diverses, génétiques (mutations dans divers gènes importants pour le développement du cerveau) ou infectieuses.

En particulier l'infection au cours de la grossesse par le cytomégalovirus (CMV) (1% des naissances) est une cause majeure de pathologie neuro-développementale chez l'homme. La création d'un modèle pertinent d'infection congénitale chez l'homme, doit permettre d'en comprendre certains des mécanismes, par essence encore très mal connus et non explorables chez l'homme ou dans des modèles purement cellulaires.

Notre nouveau projet vise à aborder, à étendre et à préciser, à travers l'étude d'un modèle d'infection *in utero* du cerveau en développement par le CMV de rat, modèle préalablement validé et exploré au niveau morphologique et cellulaire : i/ un certain nombre d'étapes-clés, et de mécanismes initiaux, notamment neuro-immuns, de la physiopathologie de ces infections, que nous avons identifiés dans le contexte d'un projet précédent; ii/ la participation de ces étapes et mécanismes dans l'émergence de phénotypes post-nataux, notamment neurologiques ; et iii/ la définition de stratégies de sauvetage ou de prévention précoces de ces manifestations pathologiques.

Nous utiliserons dans ce projet la technique d'injection dans les ventricules cérébraux d'embryons de rats, de particules virales (RCMV-GFP et RCMV- Δ R129-GFP) afin d'en suivre le processus infectieux dans le cerveau et les conséquences après la naissance, ceci en utilisant plusieurs souches virales recombinantes. Des analyses prénatales et postnatales à différents stades du développement et de la maturation cérébrale seront réalisées à différents niveaux. Evidemment ces expériences seront réalisées avec un souci permanent de réduction du nombre d'animaux et de raffinement (règles des 3R). L'étude du système nerveux central, de par sa complexité d'organisation, de développement et de fonctionnement, ne saurait être envisagée hors du contexte intégré retrouvé au sein de l'organisme entier. En ce sens, seules des approches menées chez un modèle animal dont le développement cérébral présente des analogies fortes avec celui du cerveau humain, peuvent améliorer la connaissance du fonctionnement de celui-ci, de son développement, et de sa pathologie, et ainsi permettre la mise au point de stratégies thérapeutiques innovantes. Dans la mesure du possible, un même animal pourra être utilisé pour plusieurs expériences physiopathologiques. Par exemple un cerveau pourra être utilisé pour un maximum de marquages immunohistochimiques, et un même

animal sera testé pour l'ensemble des phénotypes d'intérêt durant la période d'évaluation. Ce projet sur 4 années utilisera 502 rates gestantes, qui permettront la génération de 1398 embryons et la naissance de 1986 rats. Les animaux seront hébergés et manipulés en environnement protégé de type A2. Le bien-être des animaux, qu'il s'agisse des rates gestantes comme de leur progéniture, sera évalué quotidiennement ; ainsi, croissance staturo-pondérale, aspect général, et comportement seront observés. L'environnement des animaux sera bien entendu enrichi, avec des objets souples (pour éviter les blessures des mères après la chirurgie) permettant aux femelles de former des petits nids douillets (mini-rouleaux de papier foisonnant ; litière de carrés de cellulose vierge). Après le sevrage, l'environnement sera enrichi avec des objets en carton (tunnel ou maisonnette) ou en bois (buchette en peuplier).

7558 Dans certaines affections la perte osseuse est excessivement importante et ne peut cicatriser spontanément à cause de l'éloignement des berges du défaut osseux.

Ces pertes de tissu osseux nécessitent une substitution pour conserver l'intégrité et assurer les fonctionnalités mécaniques et biologiques du squelette. Le comblement et la régénération des pertes osseuses est un défi majeur dans la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, du rachis ou en traumatologie. Actuellement, il existe un éventail très varié de greffes osseuses d'origine biologique ou de substituts osseux synthétiques (Biomatériaux).

Afin que ces matériaux soient utilisés chez l'homme, ils doivent passer par une série de tests *in vivo* afin d'être validés et autorisés.

Selon la définition décrite dans la bibliographie, et dans le but de reproduire une perte osseuse qui ne peut cicatriser spontanément « défaut de taille critique ». Le lapin, le chien et les petits ruminants sont les espèces les plus utilisées comme modèles *in vivo*. Ces défauts peuvent être situés en zone diaphysaire (défauts segmentaires) soumis à d'importantes sollicitations mécaniques et donc nécessitent une stabilisation chirurgicale par ostéosynthèse, ou en zone métaphyso-épiphysaire (défauts cylindriques) sans ostéosynthèse associée.

L'utilisation de défaut de taille critique fait partie de la démarche habituelle d'évaluation des substituts osseux. Aussi, les protocoles de recherche faisant appel à ce type de modèles sont fréquemment mis œuvre.

Le projet concerne des protocoles répétitifs mis en œuvre plusieurs fois par an, comportant à chaque fois un témoin positif/matériau de référence et/ou autogreffe (témoin positif) et le matériau à évaluer, qu'il s'agisse d'un biomatériau seul ou de composites (biomatériaux combinés avec des cellules associées ou non à des molécules actives) issus de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Le nombre total des lapins prévus dans ce projet sur 5 ans sont 120 lapins. Le nombre d'animaux est ici une moyenne estimée sur la base des études réalisées régulièrement depuis des années et qui font partie des prestations couramment offertes.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Biomatériau testé préalablement *in vitro*, animaux utilisés lors des phases nécessitant des essais *in vivo*.

Réduction : utilisation de tests statistiques non paramétriques.

Raffinement : gestion de la douleur per et postopératoire, définition des points-limites.

7559 Les Ultrasons Focalisés de Haute Intensité (HIFU) peuvent pénétrer en profondeur dans les tissus et créer d'importantes lésions thermiques sans pour autant nécessiter un contact direct entre la sonde et le tissu à traiter.

Ce projet a pour but de développer un nouveau dispositif médical HIFU pour le traitement des foyers cardiaques impliqués dans la survenue d'arythmie cardiaque. Les deux pathologies spécifiquement ciblées sont la fibrillation atriale et la tachycardie ventriculaire. A l'aide de ce dispositif, une nouvelle stratégie de traitement mini-invasive est expérimentée. Elle consiste à réaliser des lésions thermiques cardiaques au sein de l'oreillette gauche ou du ventricule gauche grâce à une énergie ultrasonore délivrée au travers de l'œsophage.

Après avoir validé cette nouvelle technique de traitement à l'aide de simulations numériques, d'expérimentations *ex vivo* et *in vivo* sur modèle porcin, ainsi qu'une première série d'essais sur trois individus de type babouin, le projet d'expérimentation animale présenté consiste à réaliser à nouveau un traitement sur le modèle primate. Cette étude sera effectuée sur trois primates de type babouin.

Une étude numérique et des expérimentations *ex vivo* ont été effectuées et ont permis de démontrer le potentiel du projet. La réalisation du traitement par HIFU nécessite que les cavités cardiaques soient remplies de sang et que le cœur soit battant afin de vérifier la faisabilité de la procédure dans des conditions *in vivo*.

Le nombre d'animaux a été fixé au minimum statistique acceptable pour démontrer la fonctionnalité du dispositif thérapeutique dans l'objectif de satisfaire à la règle des 3R. Le projet est réalisé sur deux sites différents, ainsi sur notre site, nous ne prenons en charge que la partie imagerie par IRM qui est un examen non invasif. Dans ce cadre, toutes les mesures sont mises en place afin de limiter l'angoisse des animaux, par l'implication de personnes compétentes qui connaissent et suivent les animaux et par la prise en charge médicamenteuse la plus adaptée.

Tout au long du projet et pour l'EU concerné par cette demande, les animaux seront suivis par un vétérinaire spécialisé ainsi que l'équipe s'occupant des animaux. Les animaux seront transportés par un transporteur agréé, dans des conditions prenant en compte leur bien-être (alimentation, suivi régulier, cages mobiles avec fond mobile / cache recouvrant la cage...). A leur arrivée sur le site, les animaux sont mis dans une salle dédiée permettant une attente dans les meilleures conditions (ventilation, luminosité naturelle...). Lors de leur examen IRM, les animaux seront sous anesthésie générale selon le protocole défini. L'examen IRM n'engendre aucune douleur ni souffrance. A leur réveil, ils seront pris en charge par le vétérinaire et suivi tout au long de cette phase. Les animaux regagneront ensuite leur hébergement (autre EU) dans les mêmes conditions.

7560 Les maladies rares sont des maladies qui touchent peu de personnes, 1 sur 2000 en Europe, 80% ont une cause génétique. Peu de traitement et peu d'espoir d'amélioration sont disponibles pour les patients. Les différents types de mucopolysaridoses font parties des maladies rares, d'origine génétique, héréditaires, elles sont dues à une enzyme défectueuse. Cette enzyme ne fonctionnant plus correctement, des sucres particuliers : les glycosaminoglycanes s'accumulent de façon anormale dans les tissus de différents organes perturbant leur fonction et leur développement. Les symptômes sont variés en fonction de l'organe atteint, et leur évolution est variable d'un patient à l'autre.

Il existe plusieurs types de mucopolysaccharidose, les symptômes du type VI ou maladie de Maroteaux-Lamy, apparaissent tôt chez de jeunes enfants : notamment un faciès grossier, une déformation progressive du squelette, une augmentation de la taille du foie et de la rate, des atteintes oculaires sous forme d'opacité cornéenne. Les facultés mentales sont normales, l'espérance de vie est courte, inférieure à 30 ans.

Notre but est d'étudier l'atteinte oculaire chez des souris portant la mutation responsable de la mucopolysaccharidose de type VI et l'efficacité d'un médicament sur ces atteintes oculaires.

A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de mimer l'œil dans son environnement et dans sa globalité fonctionnelle. En effet, l'œil est composé de différents tissus de physiologie différente soumis aux variations environnementales, aux interactions des tissus et organes voisins. Le projet nécessitera donc d'avoir recours à des animaux compte tenu des particularités de l'organe concerné par le projet et l'absence de méthode alternative.

Pour ce projet nous utiliserons au maximum 480 souris sur 5 ans. Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les évaluations en lampe à fente et mesure de PIO se font sur animal vigile avec une contention douce par un personnel formé à la manipulation des souris. Les autres évaluations cliniques (pratiquées couramment chez l'homme) se font sous anesthésie légère pour éviter le stress de l'animal qui sera ensuite placé dans des armoires chauffantes pour éviter une hypothermie, des larmes artificielles sont instillées jusqu'au réveil pour éviter le dessèchement de la cornée. Les examens seront regroupés pour limiter le nombre d'anesthésie. Les animaux sont hébergés, en groupe dans des cages contenant un enrichissement adapté à l'espèce pour améliorer le bien-être de

l'animal. Ce projet a été soumis pour évaluation à un comité d'éthique et sera suivi par la structure en charge du bien-être animal de l'établissement.

7561 Ce projet de type répétitif concerne le suivi de principes actifs, de métabolites d'ingrédients et/ou de biomarqueurs dans les prélèvements biologiques. Les études de pharmacocinétique ont pour objectifs de déterminer les facteurs pharmacocinétiques impliqués dans les processus d'absorption, distribution, métabolisme et élimination (ADME), mais aussi de choisir les voies d'administration et la forme galénique du produit, d'adapter les posologies pour son utilisation future, de comparer la biodisponibilité entre les formulations, ainsi que de définir l'impact de l'état physiologique sur l'ADME du produit. Les informations produites sont donc essentielles dans le développement et la mise sur le marché d'un médicament vétérinaire.

Ces études sont à considérer chez l'espèce cible (chats, chiens ou furets cliniquement sains) dans le cadre de l'efficacité et/ou de la sécurité du produit vétérinaire. De plus, les essais préliminaires sur rongeurs pourront permettre la pré-sélection de formulations, de voies d'administration ou de posologies avant de tester chez l'animal cible.

Il n'existe pas à ce jour de méthode alternative permettant d'évaluer la pharmacocinétique de formulations vétérinaires sur un animal vivant.

Les profils et paramètres cinétiques seront déterminés après administration unique ou répétée du produit vétérinaire. Ces études seront composées d'une ou plusieurs périodes de traitement et organisées selon un design simple ou complexe (en parallèle ou croisé). Entre chaque période de traitement, une période d'attente sera définie pour permettre l'élimination du produit administré précédemment (principe actif et métabolites) et de ses effets pharmacologiques.

Des mesures seront également prises afin de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse lors de l'expérimentation :

- mise en place d'une période d'acclimatation aux conditions de l'étude,

- hébergement des animaux de préférence en groupe, individuellement si justifié et limité au maximum, avec présence d'enrichissement du milieu adapté à l'espèce,

- observation des animaux à minima quotidiennement, plus souvent à l'apparition de signes cliniques ou après des prélèvements pouvant affecter le bien-être de l'animal,

- définition de points limites précis et spécifiques pour chaque étude,

- prélèvements sanguins et volumes d'administration réalisés selon les recommandations éthiques

- réalisation de certains actes (administrations ou prélèvements douloureux) sous anesthésie et/ou médication (anti-inflammatoires et/ou anti-douleur) sauf si incompatible avec l'objectif de l'étude (ex: impact sur les analyses ou sur le profil ADME).

Lors de ces études, les animaux seront suivis sur le plan général. L'espèce, le nombre d'animaux, la voie d'administration et la dose seront justifiés pour chaque étude. Des points limites sont mis en place spécifiquement pour chaque étude. Les animaux auront accès à des enrichissements du milieu, spécifiques à l'espèce. Le nombre d'animaux estimé pour la période de 5 ans est de 1250 soit 250 de chaque espèce : souris, rats, chats, chiens, furets.

7562 Les sarcomes sont des tumeurs des tissus mous très hétérogènes sur le plan génétique et clinique. Les mécanismes de développement de ces tumeurs restent encore mal identifiés et il existe très peu de marqueurs associés à leur évolutivité. Pour certains sous types comme les fibrosarcomes agressifs, peu de traitements efficaces existent et peu de modèles animaux en permettent l'étude. Il a été montré que des souris déficientes pour des gènes associés à l'induction de sénescence (locus *Ink4/Arf*) développent spontanément des tumeurs de différents types après 200 jours de vie et dans certains cas des sarcomes. Nous avons introduit dans ce modèle de souris la déficience du gène *Vnn1* (pantetheinase) connu pour réguler l'activation des myofibroblastes lors de processus de réponse inflammatoire à un stress. Sachant que l'inflammation chronique fait souvent le lit des tumeurs, nous avons montré que ce modèle animal permettait de récapituler les conditions d'émergence de fibrosarcomes chez la souris. Dans le contexte du fibrosarcome, la *Vnn1* apparaît donc à la fois comme un marqueur des tissus tumoraux et surtout comme un gène suppresseur de

ce type de tumeur. Ainsi la Vnn1 constitue une nouvelle cible diagnostique, voire thérapeutique de ces tumeurs.

L'objectif de la demande actuelle est de tester cette hypothèse à l'aide de lignées cellulaires tumorales qui après greffe évoluent en sarcomes dans lesquelles l'effet de la molécule Vnn1 peut être testé en combinant des approches *in vitro* et *in vivo*. Les cellules sont greffées chez des souris immunodéficientes ce qui permet d'accélérer le développement tumoral, réduisant le protocole expérimental de plusieurs mois à 3 semaines. Le nombre de souris est estimé à 250 sur une période de 3 ans. Cette approche permet de réduire le nombre d'animaux, de raffiner le modèle d'étude et dans certains cas de remplacer les souris par des tests *in vitro*.

La souffrance des souris est réduite car les cellules tumorales sont injectées en sous cutané dans le dos, la croissance de la tumeur est visible à l'œil et à la palpation, les souris ne perdent pas de poids pendant la période expérimentale et gardent une vitalité normale. Nous prévoyons l'euthanasie des souris dès l'apparition d'une masse tumorale supérieure à 1 cm³, en l'absence de tout signe d'affaiblissement général (prostration, fièvre, perte de poids, non alimentation, hémorragie ou surinfection, situations jamais observées).

Les animaux sont hébergés dans les conditions suivantes : Le nombre de souris par cage est limité à 5 adultes. La température, la photopériode et l'hygrométrie sont régulées. Des plages de calme sont instaurées dans les animaleries. Les souris disposent de matériel pour confectionner des nids, ainsi que de dômes protecteurs pour les animaux trop exposés à la lumière.

7563 La thérapie génique consiste à introduire dans une cellule malade une copie normale d'un gène sous forme d'ADN complémentaire. Son objectif est de corriger ou ralentir la progression d'une maladie, qu'elle soit héréditaire ou acquise. Les vecteurs recombinants dérivés des Virus Adeno-Associés ou AAV sont des vecteurs de choix pour la thérapie génique car ils assurent un transfert de gène thérapeutique sûr et efficace dans différents tissus et organes tels que l'œil, le muscle, le foie ou le cerveau, permettant de traiter un large éventail de maladies. Il existe différents sérotypes de vecteurs AAV, certains types ayant la propriété de cibler un organe ou un type cellulaire en particulier.

Ce projet s'intéresse plus particulièrement au transfert de gène dans le foie, qui est une cible privilégiée pour un transfert de gène thérapeutique, à la fois pour traiter les maladies touchant purement la fonction hépatique et pour traiter des maladies touchant une fonction extrahépatique. Dans ce dernier cas, le foie sera pourvoyeur d'une protéine thérapeutique qui sera sécrétée dans la circulation sanguine pour atteindre ensuite son site d'action.

Jusqu'alors, les vecteurs AAV de sérotype 8 et 9 ont été largement utilisés pour le transfert de gène dans le foie, mais plusieurs sérotypes alternatifs ont récemment été identifiés et semblent montrer une affinité particulière pour le foie. Cependant, il n'existe aucune étude apportant des données strictement comparatives (utilisant des vecteurs produits et caractérisés par un même laboratoire, et comparés dans une même étude au sein d'un même centre utilisant les mêmes méthodes analytiques) concernant l'efficacité de transduction *in vivo* et la biodistribution de ces vecteurs par rapport aux vecteurs de référence rAAV8 et rAAV9. C'est l'objectif de cette étude.

Le design expérimental inclut 16 macaques fascicularis mâles (2-3 ans, 2.5 – 3.5 kg) et séronégatifs pour les vecteurs administrés. Les animaux recevront, sous anesthésie générale, une administration d'AAV par voie intraveineuse simple. 5 groupes de 3 macaques recevront un sérotype d'AAV à tester (AAV8, AAV9 et 3 autres sérotypes de choix). Un macaque témoin (recevant le véhicule) sera également inclus. Chaque vecteur AAV portera la séquence d'un transgène rapporteur déjà validé dans ce genre d'étude. Tous les vecteurs seront injectés à la même dose.

Les 16 animaux seront suivis durant 8 semaines post injection, au terme desquelles ils seront euthanasiés pour prélèvements post mortem. Au cours de cette étude, des prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie, via une ponction au niveau de la veine fémorale, en pré-injection puis à différents temps post-injection. Ces prélèvements sanguins permettront d'assurer un suivi des paramètres hématologiques et biochimiques d'intérêt, de réaliser une quantification des différents vecteurs (qPCR) et de la protéine sécrétée par le transgène rapporteur dans le sang.

Les prélèvements post-mortem seront utilisés pour déterminer le niveau de transduction du foie par les différents vecteurs AAV, ainsi que le niveau d'expression du transgène rapporteur dans le foie. La

nature des cellules du foie transduites par chaque sérotype sera analysée par des techniques fines d'histologie. Enfin, le profil de biodistribution du vecteur sera déterminé dans les différents organes des animaux. Les résultats obtenus permettront de déterminer le sérotype le plus efficace pour une transduction sélective du foie, et donc d'adapter ensuite les protocoles à visée thérapeutique.

1-Réduction

Les sérotypes d'AAV sélectionnés dans cette étude sont ceux ayant montré *in vitro* (dans des cellules en culture, et *in vivo* chez le rongeur) un avantage potentiel pour la transduction des cellules hépatiques.

La constitution des groupes, à savoir 3 animaux/groupe, est basée sur notre expérience et le type d'analyses réalisées, et permettra d'obtenir des résultats cohérents et reproductibles. Cela semble être un nombre minimal pour assurer la robustesse des résultats sans qu'il soit excessif en termes d'animaux à inclure.

2- Raffinement

Des protocoles d'anesthésie seront mis en place selon la procédure. L'administration expérimentale par injection intraveineuse se déroulera sous anesthésie générale (anesthésie fixe avec relai gazeux). Les prélèvements sanguins réalisés au cours de l'étude, seront effectués sous protocole anesthésique permettant d'obtenir une anesthésie de courte durée (environ 10 min). Ces actes étant peu douloureux, aucun protocole analgésique ne sera mis en place d'emblée pour ces 2 procédures. Pour favoriser les échanges sociaux entre animaux et favoriser leur bien-être, les macaques seront hébergés par groupes de 2 ou 3 quand cela est possible (hors période de suivi post opératoire par exemple).

L'état général et l'alimentation des animaux seront surveillés quotidiennement par les techniciens animaliers et le vétérinaire du Centre de thérapie génique. Le Centre dispose également d'un programme d'enrichissement pour les macaques, regroupant un certain nombre d'activités : distribution de fruits frais et secs cachés dans la litière ou déposés en hauteur, visionnage de films, mise à disposition de jouets, aménagement de l'habitat.

3-Remplacement

Cette étude aura lieu chez le macaque fascicularis. En effet, une telle étude ne peut être réalisée chez le rongeur, des différences nettes inter-espèces ayant été mises en évidence en ce qui concerne la transduction avec les vecteurs AAV. Les études chez le primate non humain apportent les meilleures connaissances transposables à l'homme en termes d'efficacité et de toxicité de l'AAV, ce qui permet d'extrapoler les résultats à l'homme. Ceci ne peut être obtenu *in vitro* et justifie ici notre recours à des animaux.

7564 La fibrillation auriculaire (FA) est le plus commun des troubles du rythme cardiaque, affectant 2% de la population. En Europe, plus de 6 millions de personnes souffrent de cette arythmie, et sa prévalence devrait croître d'au moins 2.5 fois dans les 50 prochaines années avec le vieillissement de la population. La FA augmente le risque d'accident cérébral de 5 fois, le risque d'insuffisance cardiaque de 3 fois, de 2 à 3 fois la probabilité d'une hospitalisation et de 2 fois le taux de mortalité.

La fibrillation auriculaire est traitée par des médicaments anti-arythmiques ce qui laisse le patient avec une consommation de médicaments à vie. Une alternative est la thérapie d'ablation avec la possibilité de guérison. La fibrillation auriculaire est principalement déclenchée par une excitation cardiaque anormale des veines pulmonaires. Cette découverte historique a mené au développement d'un traitement curatif basé sur l'ablation de ces sources veineuses. Ce traitement fait maintenant partie des recommandations internationales dans la prise en charge de la FA. Le succès thérapeutique par l'ablation n'est visible qu'après une période d'attente de 3 mois, les mécanismes de l'ablation n'étant pas totalement connus.

Le développement en cours des médicaments pour la FA est encore important car l'administration de médicaments est maintenue chez les 30 % de patients avec une AF très importante pour laquelle l'ablation n'est pas suffisante.

Ce projet est constitué de deux études effectuées par trois équipes différentes permettant de REDUIRE ainsi le nombre total d'animaux utilisés. Globalement, l'objectif du projet présent est de

comprendre comment l'aspect mécanique des lésions d'ablation peut être associé à des changements électrophysiologiques anti-arythmiques dans la FA et de tester le un médicament potentiel pour traiter la FA. Le projet est réalisé dans l'objectif bien précis de caractériser les modifications électrophysiologiques dans un modèle animal ayant une physiologie cardiaque proche de celle de l'Homme pour une meilleure extrapolation et une rapide translation à la clinique. L'utilisation de l'animal reste, à ce stade, indispensable, il n'est donc pas possible de REMPLACER le modèle animal. Le modèle utilisé (mouton) est le modèle le plus pertinent pour l'homme pour des raisons anatomiques, métaboliques et de conduction du signal électrique. 65 animaux sont nécessaires pour ce projet. Ils seront répartis en 5 groupes, selon une répartition permettant une analyse fiable des résultats.

Le respect du bien-être animal dans ce projet repose sur plusieurs mesures de RAFFINEMENT :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée (comportement normal, fourrage normal, absence de souffrances et de maladies)
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent de compléments alimentaires adaptés (Ex : pierre à sel pour les moutons)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés ; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

7565 Le diagnostic précis et précoce des tumeurs, ainsi que le développement de thérapies ciblées sont deux axes majeurs de développement en cancérologie. Dans ce contexte, les nanoparticules sont apparues comme des candidats prometteurs au cours des deux dernières décennies. En effet, les nanoparticules présentent de nombreuses propriétés qui améliorent leur détection par les différentes techniques d'imagerie et permettent leur utilisation en thérapie après activation par des stimuli externes. Dans ce cadre, nous développons des nanoparticules à base d'or et/ou d'oxyde de fer. Les premières études réalisées sur ces particules montrent qu'elles ne présentent pas de toxicité, qu'elles sont détectables par différentes techniques d'imagerie et qu'elles s'accumulent dans les tumeurs de manière passive.

Nous voulons maintenant étudier leurs propriétés de ciblage des glioblastomes. Leur biodistribution sera évaluée de manière non invasive par imagerie nucléaire dynamique sur 24h, chez le rat porteur d'une tumeur intracérébrale. A l'issue du dernier temps d'imagerie, les animaux seront sacrifiés et les tumeurs et organes prélevés afin de compléter l'analyse par des mesures ex-vivo.

La mise au point du modèle de rat porteur de glioblastome sera réalisée au sein d'un autre établissement utilisateur, et fait donc l'objet d'une demande d'autorisation distincte. La présente demande d'autorisation porte uniquement sur l'imagerie nucléaire dynamique. Au total 4 nanoparticules seront utilisées, et chaque nanoparticule sera injectée à 3 rats. Un total de 12 rats sera donc nécessaire pour cette étude.

Tout au long des protocoles *in vivo*, nous respecterons la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner). Pour le remplacement, aucune méthode alternative n'est disponible à ce stade du projet, puisque l'objectif est d'évaluer la capacité des nanoparticules à se fixer *in vivo* au niveau du glioblastome implanté en intra-cérébral. Pour la réduction, nous limitons le projet aux seules expériences considérées comme indispensables chez l'animal. De plus, l'imagerie nucléaire permet d'évaluer de manière non invasive la biodistribution d'une molécule, et donc de répéter cette mesure au cours du temps. Ainsi, la biodistribution de chaque nanoparticule sera évaluée à trois temps différents pour chaque animal, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux puisqu'on réalisera ainsi 36 mesures avec 12 animaux. Enfin pour le raffinement, les animaux seront hébergés par groupe, avec enrichissement du milieu de vie. Un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé. Les sessions

d'imagerie seront réalisées sous anesthésie volatile (Isoflurane), complétée par un mélange Air – O₂. Les animaux seront placés sur un lit thermostaté le temps de l'imagerie et la fréquence respiratoire sera enregistrée en continu afin de contrôler le degré d'anesthésie et de l'ajuster si nécessaire.

7566 L'évolution du fonctionnement hospitalo-universitaire, tant du point de vue éthique qu'économique, et des techniques endoscopiques diagnostiques et thérapeutiques ont conduit à déplacer l'apprentissage hors du bloc d'endoscopies, s'inspirant ainsi du modèle aéronautique : il s'agit de la simulation en santé.

La Haute Autorité de santé (HAS) en a fait une priorité nationale avec ses recommandations (qui s'imposent aux professionnels de santé) émises en 2012 : "jamais la première fois sur le patient"

Ce type d'apprentissage a démontré son intérêt pédagogique pour la gestuelle endoscopique interventionnelle.

Différentes études ont clairement démontré l'importance du modèle animal pour les nouvelles techniques d'endoscopie diagnostique et thérapeutique.

Là encore la HAS a préconisé le modèle animal pour l'apprentissage de l'endoscopie. Dans son "Guide de bonnes pratiques en matière de simulation en santé" publié en 2012 il est stipulé :

"L'expérimentation animale permet un apprentissage de gestes simples et complexes »

Le but de ce protocole est d'organiser des séances de formation initiale et continue en endoscopie interventionnelle complexe, diagnostique et thérapeutique sur modèle porcin, destinées aux gastroentérologues junior et senior

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

- Le modèle animal est réservé aux procédures endoscopiques de haute technicité, les gestes de base étant enseignés par simulation sur des modèles inanimés. Le modèle porcin vivant est à ce jour le seul permettant une formation technique des gastroentérologues aux gestes complexes. L'absence de formations de ce type obérerait la qualité et la sécurité des soins en médecine humaine.

- Il s'agit de procédures sans réveil pour lesquelles une anesthésie profonde et une analgésie maximale sont utilisées.

La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion.).

- Un seul sujet animal permet en une journée la formation de trois à cinq praticiens en permettant la réalisation de nombreux gestes endoscopiques successifs.

Le nombre total d'animaux est de 20 par an sur cinq ans (soit au maximum 100)

7567 Le virus Zika (ZIKV) est transmis à l'homme lors de la piqûre d'un moustique femelle à travers la peau. Originaire d'Afrique Centrale, ZIKV a diffusé en Asie puis en Océanie où il a été responsable des premières épidémies humaines à partir de 2007. Le ZIKV a atteint l'Amérique Latine en 2015 (Brésil) puis s'est propagé rapidement en Amérique Centrale et aux Caraïbes représentant aujourd'hui un problème de santé publique majeur au plan international. L'infection par le ZIKV se manifeste chez l'homme par des fièvres et des symptômes cliniques qui ressemblent à ceux de la dengue. Des épidémies récentes de fièvre Zika, il a été observé que l'infection de femmes enceintes par le ZIKV peut être responsable de malformations sévères chez le fœtus, un adulte contaminé pouvant aussi manifester des atteintes neurologiques graves. Aussi, le ZIKV est transmis efficacement par voie sexuelle y compris par des individus infectés qui ne manifestent pas les signes cliniques de la maladie.

Aujourd'hui, il n'existe pas de traitement ou de vaccin contre la fièvre Zika y compris à l'attention des femmes enceintes. Le développement d'un vaccin anti-Zika est une priorité en santé publique. Une stratégie vaccinale efficace est l'utilisation d'une souche virale ayant perdu sa virulence pour l'homme et dont l'inoculation est capable d'induire rapidement une immunité protectrice contre le pathogène sans aucun risque pour le vacciné. Elle a été appliquée avec un grand succès pour la fièvre jaune et

la rougeole. Le projet proposé est de tester chez la souris adulte le pouvoir protecteur d'une nouvelle souche virale du ZIKV qui est considérée comme candidate comme vaccin humain.

Les 3R ont bien été pris en compte.

- Remplacer : En l'absence de systèmes *in vitro* ou ex-vivo capables de reproduire la fièvre Zika chez l'Homme, l'étude des facteurs impliqués dans le pouvoir pathogène du ZIKV nécessite encore l'utilisation de modèles animaux.

- Réduire : Sur la durée de l'expérience, un total de 90 souris adultes sera inoculé avec des doses variables de la souche atténuée du ZIKV. Des prélèvements sanguins hebdomadaires seront effectués pour le suivi de la production d'anticorps protecteurs contre le ZIKV à partir de leur sérum. Un mois après l'inoculation du virus, les souris subiront une nouvelle injection de composés viraux non-infectieux afin d'augmenter spécifiquement le taux d'anticorps anti-ZIKV.

- Raffiner : Les animaux seront hébergés dans des cages contenant un environnement enrichi. Des points limites spécifiques sont mis en place. Ils seront observés et pesés quotidiennement. Le virus Zika sera injecté sur un petit nombre d'animaux (5 par groupe). Les expériences peuvent être reproduites jusqu'à trois fois à l'identique afin d'être statistiquement significatives. Les animaux inoculés sont observés une fois par jour par les expérimentateurs, week-end compris. Leur poids est déterminé journalièrement. Lors d'apparition de symptômes, concomitants à une perte de poids observée deux jours de suite supérieure ou égale à 20%, ils sont euthanasiés.

Dans le cadre de la lutte contre la fièvre Zika, les essais menés chez la souris représentent une étape critique pour valider expérimentalement notre stratégie vaccinale qui combine l'injection d'un virus vivant non virulent du ZIKV pour induire une immunité antivirale large et un rappel par des composés viraux non infectieux pour la renforcer.

7568 La formation réglementaire d'expérimentation animale niveau I (ou niveau b) permet l'apprentissage de la réglementation, du bien-être animal, de l'éthique et des bonnes pratiques de manipulation des animaux. Elle est destinée aux personnes qui auront en charge la responsabilité et la mise en œuvre de la conception des projets.

Dans le cadre de cette formation le RAM (réseau des Animaleries de Montpellier) propose une séance de travaux pratiques de 4 heures permettant aux candidats d'appréhender les bonnes pratiques des manipulations de base des animaux de laboratoire.

Le but de cette séance est de présenter les techniques de contention des rongeurs et lagomorphes ainsi que les différentes méthodes d'administrations, de prélèvements et d'euthanasie.

- Les présentations seront faites uniquement à l'aide de démonstrations vidéo pour le modèle lapin.

- Pour les rats, la contention et le gavage oral seront montrés par les formateurs et mis en pratique seulement par les candidats devant travailler avec ce modèle. Nous utiliserons deux rats (1 mâle et une femelle).

- Les candidats manipuleront eux-mêmes les souris sous contrôle des formateurs expérimentés. Les procédures effectuées seront les suivantes : 1/administration orale, 2/administration sous-cutanée, 3/ administration intra-musculaire, 4/ prélèvement sanguin au sinus-mandibulaire 5/ prélèvement sanguin à la veine caudale et 6/administration intra-péritonéale d'un anesthésique en vue d'un prélèvement cardiaque et d'une euthanasie.

Nous ferons 2 sessions successives de 18 candidats par an (présence de 3 formateurs). Chaque candidat et chaque formateur aura une souris (mâle ou femelle). Dix souris de la session 1 n'ayant subi que les procédures légères 1, 2, 3 et 4 seront ré-utilisées le lendemain pour la session 2, ce qui permet de réduire le nombre d'animaux. Nous commanderons donc 16 mâles et 16 femelles par an.

Pour répondre à la règle des 3R, nous utilisons de nombreux supports vidéos. Lorsque c'est possible, nous réduisons le nombre de souris commandées en utilisant les surplus des élevages des animaleries du RAM et les 2 rats serviront ensuite au TP d'Anatomie.

Le nombre total d'animaux utilisé sur 5 ans sera donc : 10 rats et 160 souris.

7569 En raison de l'utilisation croissante de nanomatériaux 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 particules 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.

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. La compréhension des effets pulmonaires et systémiques des nanoparticules chez l'animal de laboratoire et chez l'être humain 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. Différentes méthodes d'exposition pulmonaire à des nanomatériaux existent pour étudier leur toxicité : 1) l'instillation endotrachéale d'une suspension de nanoparticules ; 2) l'exposition par voie oro-nasale subaigüe (6 heures par jour, 5 jours par semaine pendant 4 semaines) à un aérosol de nanomatériaux. La première approche, bien que contournant les voies aériennes supérieures, permet de tester des nanomatériaux hautement toxiques ou disponibles en faibles quantités. En outre, en raison de sa facilité de mise en œuvre, elle peut servir de test de screening pour la sélection des particules dont la toxicité sera évaluée par inhalation. Les expériences menées par inhalation permettent quant à elles la distribution homogène des particules dans les poumons et leur dépôt dans tout l'appareil respiratoire. Les expositions subaigües (4 semaines) font l'objet de recommandations internationales et d'une reconnaissance en terme d'évaluation du danger.

Pour les études par inhalation oro-nasale, il est nécessaire pendant les périodes d'exposition de mettre en contention les rats dans des tubes prévus à cet effet. En raison de cette contrainte, et du suivi des animaux jusqu'à 180 jours post-exposition, le bien-être des animaux sera assuré avec le suivi de l'atteinte des points limites comprenant une perte de 20% du poids corporel au cours des procédures, l'apparition d'une détresse respiratoire, 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 nanomatériaux inhalés chez l'animal de laboratoire et chez l'Homme est encore parcellaire et les études chez les rongeurs ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des cultures de cellules en raison de la complexité des mécanismes physiologiques considérés. Le principe de Réduction est mis en œuvre dans le cadre du choix des nanomatériaux testés. En effet cette sélection est réalisée après l'évaluation de travaux d'autres laboratoires partenaires européens ayant menés des travaux *in vitro* ou *in vivo*. Ainsi seuls les nanomatériaux les plus pertinents seront testés dans ce projet. Cette collaboration européenne permettra de comparer les résultats obtenus selon différentes approches expérimentales et d'évaluer si les tests *in vitro* mis en œuvre sont prédictifs des effets observés chez l'animal. 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 1156 rats Sprague Dawley mâles de 8 semaines sera nécessaire à l'ensemble du projet.

7570 L'insuline joue un rôle clef dans la régulation de l'homéostasie du glucose. La sensibilité à l'insuline peut être modifiée dans de multiples conditions physiologiques (puberté, grossesse,..), pathologiques (obésité, sédentarité, diabète de type 2, hypertension artérielle, dyslipidémies, dysfonctions ovariennes, infections,..) et pharmacologiques (corticothérapie, stéroïdes sexuels, thiazolidinediones,..). Le plus souvent, elle est réduite et on parle de résistance à l'insuline ou d'insulinorésistance. Dans la population générale, la sensibilité à l'insuline est extrêmement variable avec une probable contribution génétique à cette variabilité

L'importance de la mesure de l'insulinorésistance pour évaluer le risque cardiovasculaire ou l'effet de programmes d'intervention est maintenant bien établie. Il est donc nécessaire d'avoir des méthodes fiables et reproductibles pour mesurer l'insulinorésistance *in vivo*. Le clamp euglycémique hyperinsulinémique est la méthode de référence

Son principe repose sur une perfusion d'insuline à débit continu associée à une perfusion variable de glucose, adapté de façon à maintenir la glycémie constante. Si la dose d'insuline est suffisante pour inhiber la production hépatique de glucose, la quantité de glucose perfusé est le reflet de la sensibilité à l'insuline, plus elle sera importante plus la sensibilité est élevée.

L'objectif de cette formation est d'apprendre cette technique à de nouveaux personnels. D'un point de vue pratique nous utiliserons 24 souris pour chaque formation divisée en 3 lots.

Le premier lot composé de 4 souris permettra une réappropriation de la technique.

Le deuxième lot composé de 12 souris, permettra un apprentissage aux nouveaux utilisateurs, de la technique chirurgicale pour la mise en place du cathéter au niveau de la veine fémorale

Le troisième lot composé de 8 souris servira à réaliser la partie chirurgicale suivie de la technique du clamp euglycémique hyperinsulinique chez la souris.

Un maximum d'une formation par an sera réalisé pendant la durée du projet, un maximum de 120 souris sera donc utilisé.

Remplacement : Pour réaliser cette formation, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris) d'autant plus, que ce modèle est déjà largement utilisé et bien étudié dans la pathologie du diabète du fait des similitudes avec la pathologie humaine.

Raffinement : Le modèle utilisé ici engendre une douleur modérée lors de la mise en place du cathéter. Après la chirurgie les souris recevront un traitement analgésique, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient mis à mort pour éviter toute souffrance.

Enfin, le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés sera optimisé pour que chaque personnel soit correctement formé à cette technique.

7571 L'asthme allergique est une maladie inflammatoire des bronches qui touche en France environ 6% de la population et qui est à l'origine de 1000 décès par an. On le définit comme une gêne respiratoire plus ou moins sévère due à une réaction du système immunitaire du patient à la présence d'un allergène. Les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu au cours de l'asthme allergique sont complexes et pas encore tous élucidés. Ainsi, une meilleure compréhension est nécessaire pour développer de nouvelles approches thérapeutiques. Il a été montré par plusieurs groupes que les nucléotides (ATP, ADP) jouent un rôle dans cette pathologie à la fois chez l'homme et dans des modèles expérimentaux murins. Cependant, on ne connaît pas l'identité des récepteurs de ces nucléotides, ni les types cellulaires exacts impliqués dans l'inflammation allergique.

Parmi les récepteurs potentiellement impliqués dans la réponse aux nucléotides, un récepteur à l'ATP pourrait jouer un rôle central. Il est en effet exprimé à la fois par certaines cellules du système immunitaire jouant un rôle clé dans ce type de pathologie et également par les plaquettes sanguines, qui sont décrites comme étant potentiellement actrices de la réponse allergique. Notre hypothèse est que ce récepteur pourrait favoriser le développement de la réaction d'asthme allergique pulmonaire. La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle expérimental d'asthme allergique chez la souris afin de pouvoir réaliser des analyses d'échantillons (organes, sang, lavages broncho-alvéolaires.) suite à la réaction asthmatique. Ce modèle, largement accepté par différents laboratoires spécialisés, repose sur une sensibilisation des souris à de l'ovalbumine de poulet couplé à un adjuvant, suivie deux semaines plus tard, à la ré-exposition des souris à ce même allergène par voie nasale. Ce protocole expérimental conduit à une réaction allergique, telle qu'elle est observée chez l'homme, avec une infiltration cellulaire dans les poumons ainsi qu'une production d'anticorps spécifiques de l'allergène. Seront soumis à cette procédure expérimentale des souris invalidées pour le récepteur à l'ATP afin de déterminer son rôle dans cette pathologie.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Une analyse de variances de type ANOVA avec un post- test Bonferroni sera réalisée entre les groupes. Afin de réduire le nombre d'animaux

nécessaire et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront réduites au minimum et complétées par des études *in vitro* sur cellules (tests d'activation cellulaire).

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Une fiche de suivi sera mise en place afin de pouvoir contrôler l'état des animaux tout au long du protocole expérimental d'immunisation jusqu'à l'euthanasie. Quand un score de 2 est atteint, l'animal est euthanasié. Quand un score de 1 est atteint, une attention particulière est apportée à l'animal et une décision est prise : augmentation de l'enrichissement, apport de soin, euthanasie.

Ce projet nécessitera 40 souris au maximum.

7572 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés par une perte de neurones produisant la dopamine dans une région du cerveau. Cependant l'origine de cette maladie est encore mal connue. De nouvelles données suggèrent que l'accumulation anormale d'une protéine, dénommée l'alpha synucléine dans les neurones, serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques. Ce mécanisme, aujourd'hui mal compris, est considéré comme central dans la genèse et l'évolution de la maladie. Sa compréhension est donc essentielle dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques à l'identification d'un nouveau composé thérapeutique.

Des études réalisées ont montrées que l'injection d'alpha synucléine humaine (présent chez les patients parkinsoniens) dans le cerveau des rongeurs entraîne les symptômes typiques de la maladie de Parkinson et la perte des neurones dopaminergiques. L'objectif de notre étude est d'utiliser ce modèle chez la souris et d'étudier l'effet neuroprotecteur d'un composé A :

- sur les symptômes de la maladie de Parkinson.
- sur les neurones dopaminergiques.

Nous avons choisi d'utiliser 12 et 14 animaux par condition expérimentale soit 78 souris au total du projet. Ce nombre correspond au nombre d'animaux nécessaire pour une analyse statistique valide compte-tenu de la variabilité intrinsèque des paramètres comportementaux, histologiques et neurochimiques qui seront mesurés. Notre stratégie est d'induire la maladie de parkinson en effectuant des injections stéréotaxiques d'alpha synucléine dans le cerveau des souris et de les traiter chroniquement pendant 4 mois avec un composé A. Afin d'observer l'effet de ce composé sur la maladie de parkinson, le comportement moteur des animaux sera évalué (avant et après le traitement). Les animaux seront mis à mort 4 mois après les chirurgies stéréotaxiques et des analyses histologiques et neurochimiques seront faites afin de visualiser l'effet du composé sur la perte des neurones dopaminergiques.

Dans le respect de la règle des 3 R afin de réduire le nombre d'animaux, une étude préliminaire de cinétique d'absorption du composé A est effectuée à 3 doses différentes en traitement aigu (12 animaux par groupe). Cette étude nous apportera les informations qui permettent de choisir les voies d'administration et de déterminer le schéma posologique optimal (dose, fréquence d'administration). Ainsi la dose définie optimale sera utilisée pour effectuer l'étude d'efficacité du composé (Traitement chronique de 4 mois et comportement moteur) sur 42 animaux incluant les groupes expérimentaux et les contrôles.

L'analyse des effets sur le comportement moteur et la nécessité de voir son effet sur le cerveau nous contraint à utiliser des animaux. Les modèles *in vitro* actuels ne pouvant répondre à notre question. Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée sur le composé n'entraîne une souffrance chez l'animal. Les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via des molécules les plus adéquates. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout le long de l'étude.

7573 La Directive Cadre Européenne sur l'eau fixe le bon état écologique des cours d'eau et la libre circulation des espèces piscicoles. Alors que le travail d'inventaire des seuils et barrages prioritaires à restaurer a été réalisé ces dernières années, les travaux de restauration sont maintenant en cours et les propriétaires d'ouvrages doivent se mettre en conformité, selon les cas entre juillet 2017 et décembre 2018. Certains maîtres d'ouvrage sont tenus (ou décident volontairement) d'évaluer l'efficacité de ces actions en mettant en place des suivis des comportements des poissons aux abords des ouvrages et obstacles, avant et/ou après restauration. L'outil RFID est de plus en plus couramment utilisé pour quantifier ces comportements. En effet, il permet de mesurer la proportion d'individus qui cherchent à migrer vers l'amont et ceux qui parviennent effectivement à franchir l'obstacle (détection en amont de celui-ci). Il faut pour cela procéder au marquage d'un grand nombre d'individus à l'aide de micro-puces RFID appelées PIT tags et équiper les ouvrages ou obstacles à l'aide d'antennes de détection reliées à un lecteur-enregistreur. Le suivi des poissons marqués est ensuite réalisé sur une période d'une année minimum, avant reconduction éventuelle des marquages sur plusieurs années.

Le présent projet regroupe deux études ayant un objectif commun, à savoir l'évaluation de la franchissabilité de différents ouvrages ou obstacles à la migration. La première étude vise à évaluer la franchissabilité d'un passage sous tuyau (appelé buse d'écoulement) d'une rivière à salmonidés. La truite est la seule espèce concernée. La seconde étude vise à évaluer la franchissabilité d'une passe à poissons et de trois seuils (petites chutes difficilement franchissables par les poissons) dans deux cours d'eau salmonicoles connectés, puisqu'ils appartiennent au même bassin versant. La truite et l'ombre commun sont les espèces d'intérêt.

Le projet s'échelonne sur 5 années. Un total de 4400 poissons seront marqués à l'aide de PIT tags : 3800 truites et 600 ombres communs. Les différents ouvrages / obstacles seront équipés d'antennes fixes : 2 antennes (amont et aval) pour les passes à poissons et les seuils; 1 seule antenne fixe en amont de la buse d'écoulement car des prospections complémentaires à l'aide d'antennes mobiles seront réalisées. Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée (règle des 3 R : Remplacement) ; en outre, il est indispensable d'avoir recourt à des poissons sauvages pour étudier leur comportement in natura. L'effectif de 4400 individus marqués toutes espèces confondues est le minimum pour obtenir un échantillon représentatif des comportements migratoires au sein de la population pour évaluer la variabilité interannuelle de ces comportements, tout en limitant au maximum les atteintes sur la population (Règle des 3R : Réduction). En effet, seule une fraction minoritaire des individus va migrer, l'autre fraction est résidente et ne sera pas détectée. Les marques PIT tags seront implantées dans la cavité péritonéale. Les animaux seront anesthésiés lors de l'opération, leurs constantes vitales seront surveillées et leur réveil post-opératoire assuré avant de les relâcher dans le milieu naturel (règle des 3R : Raffinement).

7574 Les traitements classiques de la polyarthrite rhumatoïde et des maladies inflammatoires de l'intestin sont, pour une proportion non négligeable des patients, inefficaces au long cours, voire source d'effets indésirables. Bien que les biothérapies (anticorps monoclonaux) aient renforcé l'arsenal thérapeutique de ces maladies depuis une quinzaine d'années, des résistances et des échappements thérapeutiques sont toujours rapportés. Ainsi, il existe une réelle urgence à explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. Le récepteur PPAR γ agit comme activateur de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la régulation de la masse grasseuse. Il joue un rôle majeur dans le métabolisme des acides gras, la réaction inflammatoire et le développement embryonnaire.

Des études internationales suggèrent que l'activation pharmacologique de PPAR γ semble une alternative séduisante aux traitements actuels de l'inflammation. Nous avons récemment obtenu, par une collaboration internationale, les premières souris totalement déficientes pour PPAR γ grâce à une répression du gène chez l'embryon. Dans ce projet, nous souhaitons caractériser ces souris d'un point de vue articulaire et intestinal car des expériences préliminaires y ont montré la présence d'une inflammation.

Le microbiote intestinal, anciennement appelé flore intestinale, est l'ensemble des micro-organismes vivant dans cet environnement. Le dérèglement du microbiote digestif pourrait contribuer au développement de pathologies auto-immunes telles que la polyarthrite rhumatoïde. PPAR γ pourrait

intervenir comme régulateur clé de l'équilibre intestinal en maintenant la production locale de molécules antimicrobiennes naturelles, largement impliquées dans l'immunité.

Dans ce projet, nous souhaitons générer dans notre animalerie des souris variablement déficientes pour PPAR γ (totales; partielles ; nulles) pour répondre à 4 objectifs spécifiques :

1. caractériser les conséquences de l'invalidation variable de PPAR γ sur l'apparition d'une inflammation histologique intestinale et/ou articulaire chez ces souris,
2. étudier les conséquences cliniques et histologiques de la modification du microbiote intestinal par antibiothérapie chez ces souris,
3. étudier les conséquences de l'absence de microbiote intestinal (élevage en conditions stériles) chez nos souris,
4. étudier les conséquences de la modification du microbiote intestinal par co-hébergement de souris sauvages avec nos souris déficientes pour PPAR γ .

Dans ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable (remplacer), de plus génétiquement modifiés (amélioration). Il s'agit du maintien d'une lignée déjà établie, déjà implantée dans le laboratoire depuis plusieurs années. Environ 380 souris seront utilisées sur 5 ans : 140 pour l'objectif 1 et 240 pour les objectifs 2, 3 et 4. La taille des groupes repose sur les données de la littérature et la puissance des tests statistiques utilisés (réduire). Les souris sont euthanasiées soit séquentiellement (sevrage, 3 mois, 10 mois) soit systématiquement à 6 mois. Au cours de l'expérience les animaux seront pesés de façon hebdomadaire et examinés quotidiennement pour évaluer leur bien-être, notamment du point de vue articulaire (score d'arthrite) et digestif (consistance des fèces et présence de sang dans les selles). Le milieu sera enrichi (sopalin). Les points limites définis sont de 3 ordres : sévérité de l'arthrite, irritation digestive et variation pondérale. En cas d'atteinte trop sévère, l'animal sera euthanasié. Régulièrement, le score clinique, permettant de déterminer la sévérité de l'arthrite, sera calculé. Il est compris entre 0 (pas d'arthrite) et 4 (gonflement sévère avec rougeur s'étalant sur l'ensemble de la patte) et sera déterminé pour chaque patte puis le score total de l'animal sera calculé par addition des scores des 4 pattes. Ainsi, le score clinique permet d'établir un point limite qui correspond à un score total de 12. Lorsque le score atteint 12 ou plus, les animaux seront euthanasiés. Une perte de poids importante de l'animal servira de deuxième point limite (20%).

7575 Le diabète de type 1 est un désordre métabolique caractérisé par des hyperglycémies résultant d'un manque d'insuline.

La supplémentation en insuline était jusqu'à quelques années le seul traitement possible. D'autres thérapies émergentes, telles la greffe d'îlots de Langerhans pancréatiques, permettent la normalisation de la sécrétion défailante d'insuline.

Ces îlots proviennent de pancréas issus de donneurs en état de mort cérébrale ayant fait le choix de donner leurs organes. Seulement, pour espérer guérir un patient diabétique, plusieurs pancréas sont nécessaires pour pallier cette déficience de sécrétion d'insuline.

Les cellules souches pluripotentes peuvent être une alternative à ces îlots. Celles-ci ont la capacité de se différencier en toutes sortes de tissus, dont le tissu pancréatique.

Ce projet a pour but de différencier des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) en cellules pancréatiques pour les projets de recherche liés au diabète et la transplantation de cellules à insuline. En effet, les modèles cellulaires et animaux actuellement utilisés ont montré leurs limites. L'utilisation des cellules iPS permet d'obtenir *in vitro* une quantité illimitée de cellules pancréatiques. L'étape de différenciation *in vitro* peut varier de 14 à 40 jours. Après différenciation *in vitro*, les cellules seront greffées chez l'animal immuno-déficiente (souris CB 17 Scid et rat immunodéficient) afin d'étudier le devenir de ces cellules *in vivo*. Différentes approches de vieillissement et maturation seront investiguées *in vitro*. Pendant 6 mois, des dosages glycémiques et du C-peptide humain seront effectués deux fois par mois. Puis le greffon sera récupéré pour être analysé par les méthodes de morphométrie et d'immunofluorescence.

Afin de veiller au bien-être de l'animal, toutes les manipulations sont réalisées par du personnel formé aux techniques et à l'éthique animale. De plus, Les animaux seront stabulés dans un environnement favorable à leur bien-être (cycle jour/nuit 12h/12h; nourriture et eau ad libitum; enrichissement de la

cage avec tunnel et nid de cellulose). Concernant le raffinement pour réduire la douleur l'intervention chirurgicale se fait sous anesthésie à l'isoflurane, avec un complément d'anesthésie locale (xylocaïne en spray) et un traitement de la douleur post-opératoire (buprénorphine toutes les 6-12 heures).

Les animaux seront manipulés (prise de sang, chirurgie) dans une pièce dédiée et séparée de la salle d'hébergement. Pour ce travail nous aurons besoin d'utiliser 60 souris (souche CB17-scld) et 20 rats Nude, que le travail *in vitro* (culture cellulaire) ne peut remplacer car Le devenir des cellules à long terme *in vivo* ne peut se faire que dans un organisme vivant, car ces cellules ne peuvent maintenir leur état mature qu'au sein d'un organisme qui les sollicitera (production d'insuline, et autres hormones).

7576 Les microARNs sont une classe de petits ARN non-codants impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. De plus en plus d'évidences suggèrent que ces ARNs détiennent un fort potentiel médical. Dans notre laboratoire, nous cherchons à comprendre comment les microARNs participent à l'élaboration et au contrôle des comportements complexes chez la souris. Pour cela, nous nous servons d'un modèle expérimental dit 'physiologique', le déclin des fonctions cérébrales observé chez l'animal âgé. Ce projet vise à : 1) identifier les microARNs dont l'expression est modifiée au cours du vieillissement ; 2) établir le rôle des microARNs candidats dans certains comportements. Nous envisageons d'effectuer deux types d'expériences, Pour le premier objectif, nous soumettrons des cohortes d'animaux jeunes et âgés (n=504) à 11 différents tests de comportement (inoffensifs et non-douloureux). Ces tests ont pour but l'identification des individus âgés présentant des déficits fonctionnels. A la fin des tests et par des études de génomique, nous chercherons à identifier les miARNs candidats (miRNAs dont l'expression est altérée chez les animaux présentant des défauts comportementaux). Pour le deuxième but, nous modifierons les niveaux d'expression des microARNs candidats (surexpression ou diminution) dans des régions précises du système nerveux central via l'injection de vecteurs viraux à bas risque biologique (vecteurs adeno-associés). La comparaison des performances comportementales avant et après ces injections nous aidera à comprendre le rôle des miARNs cibles.

En raison des questions biologiques adressées par notre étude, ces manipulations ne peuvent être réalisées que chez la souris vivante (pas de remplacement possible). Par contre, le fait d'utiliser un modèle physiologique (vieillesse de souris sauvages) évitera la génération de nouvelles souches transgéniques présentant des anomalies/handicaps. De plus, nous nous procurerons des souris âgées que les éleveurs ont retirées des accouplements et destinées, sans notre étude, à l'euthanasie. Nos données préalables nous ont, également, permis un calcul approximatif de la taille de la cohorte optimale pour ces expériences permettant de limiter le nombre d'animaux sans diminuer pour autant la puissance de nos analyses. Pour finir, des nombreuses mesures seront prises pour éviter toute sorte de souffrance et respecter le bien-être des animaux. Les procédures chirurgicales se réaliseront sous anesthésie par le personnel ayant les autorisations nécessaires. Pour limiter la douleur post-opérative, les animaux recevront deux injections sous-cutanées de buprénorphine 0.05mg/kg, à la fin de l'intervention et 12 h après. Les animaux seront suivis et observés quotidiennement avec une échelle de bien-être servant à évaluer leur état. Le nombre total d'animaux à utiliser dans ce projet est estimé à 1416 souris.

7577 La greffe d'os autologue est actuellement le traitement standard dans les pertes de substance osseuse résultant de traumatismes ou de la résection de tumeurs. Cependant, le stock osseux du patient est limité et le prélèvement a une morbidité non négligeable (second site opératoire, infection, douleur). L'objectif principal de cette expérimentation est d'évaluer une alternative à la greffe osseuse à partir de biomatériaux imprimés en 3D dans un modèle pré clinique au niveau de métatarses de brebis. Les objectifs secondaires sont l'étude de la vascularisation et l'apport de cellules souches mésenchymateuses dans la régénération osseuse. Les animaux seront placés sous anesthésie générale avant observation au scanner médical et opérés. Un défaut osseux diaphysaire de 40 mm sera créé au niveau du métatarse et stabilisé avec du matériel d'ostéosynthèse. Le comblement sera réalisé avec le biomatériau 3D. Après la chirurgie, les animaux recevront des analgésiques appropriés et seront suivis dans leur comportement. Un scanner sera réalisé à 1 et après la chirurgie. La régénération osseuse sera évaluée par scanner, radiographie et histologie. Cette expérimentation sera réalisée selon les règles éthiques des 3R : le remplacement n'est pas possible car il n'existe pas

d'alternative à l'expérimentation animale pour évaluer la régénération de grands défauts osseux ; la réduction du nombre d'animaux à n=7/groupe pour 5 groupes soit 35 brebis adultes est défini par un test de puissance statistique ; le raffinement est assuré par un hébergement en groupe sur litière en paille avec eau à volonté. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers pour la prise alimentaire, le comportement et de l'état général. Les chirurgies seront réalisées par des chirurgiens expérimentés. Après l'intervention chirurgicale, les animaux seront hébergés en groupe avec une litière en paille dans la même pièce, avec eau à volonté. Les animaux seront surveillés quotidiennement par les animaliers pour la prise alimentaire, le comportement et de l'état général. Sans réponse physiologique satisfaisante, il sera procédé à l'euthanasie par surdosage de barbiturique suivie du prélèvement du site lésionnel pour transmission aux scientifiques.

7578 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène Mtm1 qui code pour une protéine ubiquitaire, la myotubularine.

Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour la myopathie myotubulaire en apportant à l'aide d'un virus de type AAV (virus associé à l'adénovirus) un gène homologue au gène muté dans les muscles squelettiques de souris déficientes en myotubularine.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle *in vitro* capable de reproduire avec fidélité le phénotype de la myopathie myotubulaire (pas de remplacement possible). Effectivement, bien qu'un modèle cellulaire présentant un phénotype quantifiable (défaut de prolifération et augmentation de la mort cellulaire) ait été décrit, il ne permet pas d'étudier les défauts majeurs observés dans la maladie, notamment les défauts de structure de la fibre ou la perte de force musculaire. A l'opposé, les modèles murins reproduisent avec fidélité l'ensemble des aspects cellulaires et phénotypiques (faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie).

Afin de faire des preuves de concept thérapeutique, l'utilisation d'animaux n'est pas remplaçable car il n'existe à l'heure actuelle aucun modèle pouvant reproduire avec fidélité le phénotype de la myopathie myotubulaire *in vitro*.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés par groupe, le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes).

Les souris malades présentant un défaut de motricité, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de leur en faciliter l'accès.

Si une souris atteint le point limite de niveau 2, elle sera soulagée par l'administration de molécules antidouleurs. Si le niveau 3 est atteint, les animaux seront euthanasiés.

Les gènes thérapeutiques apportés n'ont pas montré d'effets néfastes dans des études précédentes et ne devraient pas entraîner une réponse immunitaire. On ne devrait donc pas créer de dommages supplémentaires aux souris modèles, mais amener au contraire à une importante correction de la maladie.

Notre projet durera 3 ans et nécessitera l'utilisation totale de 200 souris.

7579 Des résultats obtenus au sein de notre laboratoire ont démontré le rôle crucial de la flore intestinale dans la croissance tumorale et l'efficacité de traitements anti-cancéreux. En effet, ces résultats montrent que certaines bactéries de la flore intestinale permettent la réinduction d'une réponse immunitaire anti-tumorale qui se trouve supprimée par les cellules cancéreuses. Ainsi, ces bactéries réduisent la croissance tumorale et amplifient l'effet de chimiothérapie et immunothérapie connus pour activer le système immunitaire.

Notre objectif est d'analyser l'influence de différentes bactéries de la flore intestinale sur l'activation du système immunitaire et sur l'efficacité anti-tumorale de chimiothérapies dans le cancer du sein. Par ailleurs, nous voulons déterminer le mécanisme d'action de ces bactéries dans l'activation du système immunitaire anti-tumoral.

Pour cela, nous administrerons des bactéries spécifiques puis, après injection de lignées tumorales, les souris seront traitées ou non avec la chimiothérapie. Ces expérimentations vont nous permettre de déterminer les bactéries améliorant la réponse aux chimiothérapies, et ainsi d'envisager une supplémentation en bactéries comme traitement adjuvant (additionnel) aux traitements anti-cancéreux.

Ce projet nécessite des procédures expérimentales utilisant des animaux vivants et plus particulièrement la souris. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire hors d'un organisme du fait de sa complexité. Le projet nécessitera 5206 souris. Ce nombre important d'animaux se justifie par les différentes combinaisons thérapeutiques, les différentes souches bactériennes et les différents types de cellules tumorales utilisés. Les procédures expérimentales mises en jeu respecteront les exigences de remplacement, réduction et raffinement. Elles ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants (nécessité d'un organisme entier, vivant, proche de l'homme, porteur de tumeur). Pour la réalisation de ce projet, l'utilisation d'animaux vivants est indispensable car seul un animal vivant, entier, peut permettre d'étudier dans leur globalité, l'immunité anti-tumorale et l'effet de chimiothérapies sur la réponse anti-tumorale dans un contexte tumoral, avec toutes les interactions nécessaires, impossibles à reproduire *in vitro* ou *ex vivo*.

Les groupes seront constitués d'un minimum d'animaux assurant la fiabilité des résultats en termes de statistiques. Le nombre de prélèvements pré- et post-mortem seront optimisés afin d'étudier le plus de paramètres possibles et ainsi d'éviter la répétition d'expérimentation. Enfin, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Ainsi, un anesthésique local sera appliqué à chaque injection. Les points limite seront strictement définis et appliqués.

7580 La myopathie myotubulaire est une maladie congénitale très sévère des muscles squelettiques. Cette pathologie affecte 1 garçon sur 50 000, n'a aucun traitement et conduit dans la majorité des cas au décès prématuré du patient. Elle est due à des mutations dans le gène *Mtm1* qui code pour la myotubularine, une protéine impliquée dans le contrôle des membranes de la cellule. Dans la pathologie, les membranes cellulaires sont anormales, ce qui altère le passage de l'information nerveuse aux membranes du muscle et affecte le fonctionnement musculaire.

Notre projet vise à développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour la myopathie myotubulaire en amenant dans les muscles une molécule capable de corriger les anomalies des membranes des cellules musculaires. Afin d'identifier une molécule efficace, il faudra en concevoir et en tester plusieurs.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour faire ces preuves de concept thérapeutiques, car les modèles cellulaires de la maladie ne permettent pas d'étudier les défauts liés à la fonction du muscle (perte de force non mesurable sur des modèles cellulaires, pas de remplacement possible). A l'opposé, les modèles murins reproduisent avec fidélité l'ensemble des aspects cellulaires et les symptômes de la maladie (faiblesse musculaire, réduction de l'espérance de vie).

L'efficacité relative des molécules sera testée en premier sur ces cellules normales en culture, et seules les molécules les plus efficaces seront administrées aux souris, ce qui permettra de réduire le nombre d'animaux utilisés. Selon l'efficacité des molécules produites, ce type de criblage peut permettre d'économiser jusqu'à 100 souris.

Afin de raffiner nos études, un aliment spécifique hydratant et nourrissant sera placé au sol dans la cage afin de faciliter l'accès aux souris malades qui présentent un défaut de motricité et des point limites seront définis : si la souris atteint le niveau 2, elle sera soulagée par l'administration de molécules antidouleurs. Si le niveau 3 est atteint, les animaux seront euthanasiés.

Les molécules thérapeutiques apportées ne devraient pas entraîner une réponse immunitaire et seront véhiculées dans un tampon salin neutre : elles ne devraient donc pas créer de dommages supplémentaires aux souris modèles. Un important bénéfice thérapeutique est au contraire attendu, comme le suggèrent des études précédemment réalisées sur un modèle de la maladie chez l'insecte.

Le nombre de souris nécessaire a été estimé à 10 souris par groupe par une étude statistique prédictive (test de comparaison des moyennes). Les souris seront élevées et reproduites dans notre établissement utilisateur. Notre projet durera 2 ans et nécessitera l'utilisation totale de 125 souris.

7581 L'évaluation et le développement de nouvelles méthodes, molécules, dispositifs et techniques pour les affections de l'appareil urinaire et ses annexes par des méthodes de chirurgie et mini-invasives nécessite une phase de recherche préclinique et développement qui permet de mettre au point ces méthodes et vérifier leur sécurité. La chirurgie uro-néphrologique s'est développée rapidement dans la deuxième moitié du XXème siècle avec par exemple l'avènement de la transplantation rénale (années 60-70), ou encore de l'hémodialyse (années 50-60) permettant de sauver des millions de personnes par an, avec l'avènement de nouvelles technologies comme les circuits extracorporels avec filtre de dialyse permettant la déviation du sang vers un filtre externe et ainsi sa purification artificielle. Il est possible dès lors de pallier à des dysfonctions importantes en du rein par exemple. Les progrès diagnostiques et thérapeutiques se développent rapidement pour l'ensemble des organes de l'appareil urinaire et ses annexes. L'évaluation de nouvelles méthodes pour la réparation du tissu en uro-néphrologie s'intéressent au diagnostic, la réparation / remplacement / palliation de différents segments de l'appareil urinaire et ses annexes. La limite des techniques actuelles réside par exemple dans leur invasivité, la nécessité de recours à la machine de dialyse, ainsi que la durabilité des dispositifs / matériaux utilisés qui peuvent être « rejetés » par l'organisme. L'avantage escompté est une amélioration de la durabilité des implants (éviter le rejet et ainsi les ré-opérations parfois multiples des patients) et réduire le traumatisme tissulaire, de diagnostiquer et pallier à une dysfonction d'un ou plusieurs segments de l'appareil urinaire. Les modèles animaux utilisés dans ce projet suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, et plateau technique de bloc opératoire et d'imagerie de pointe). La chronologie médicale inclura l'implantation et le suivi par imagerie de type échographique, angiographique, et scanner par exemple et de suivi clinique et examens complémentaires permettra d'assurer un cadre d'évaluation scientifique optimal mais aussi un suivi rapproché de l'évaluation de l'état de santé générale et du bien-être des animaux implantés. Des modèles animaux de grande tailles seront utilisés, avec environ 300 implantations par an sur une durée de 5 ans, sur des porcins (n. 200), ovins (n. 50) et canin (n. 50). Cela permettra sur 5 ans de valider les différents prototypes et réaliser les tests règlementaires de sécurité requis par les autorités. Il est donc indispensable d'avoir recours à la modélisation au préalable afin de vérifier le bon fonctionnement et la sécurité. Cela doit impérativement se faire sur des organes de taille identique aux organes de l'homme dans des conditions qui reproduisent la réalité de l'organe et de vérifier les effets secondaires néfastes sur l'ensemble de l'organisme. Les tests sur l'organisme entier sont donc incontournables. Cette phase de recherche pré-clinique est le filtre indispensable pour assurer la sécurité des futurs patients. Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening échographique, angiographique, IRM, scanner / reconstruction 3D afin de simuler numériquement l'adéquation du prototype à l'anatomie (logiciel 3D). L'ensemble des tests sera réalisé sous anesthésie générale, et 3 modes d'analgésie (locale et générales (morphiniques + AINS) permettront de traiter la douleur. Ce projet permettra donc de développer des nouvelles techniques peu invasives dans le cadre des affections en uronéphrologie.

7582 Le bilan électrolytique d'une ration alimentaire (BE) se définit comme la différence entre les concentrations en mEq/kg de potassium et de sodium et celle de chlore. Il a été montré chez la truie qu'un abaissement du bilan électrolytique de la ration des truies pendant les 10 jours précédant la mise-bas pouvait favoriser la taille des portées et la survie des porcelets. Cependant, les conséquences de ce traitement sur la mobilisation osseuse de la truie n'ont jamais été évaluées alors qu'à l'instar de ce qui a été observé chez la vache laitière, il est probable que ce traitement favorise la mobilisation osseuse à une période de la vie de l'animal pendant laquelle l'os est déjà fortement mobilisé par le démarrage de la lactation. Ce projet a pour objectif de quantifier l'effet d'un abaissement du bilan électrolytique de la ration de truies avant la mise-bas sur le déroulement de la mise-bas et la survie des porcelets, sur les régulations acido-basiques de l'organisme et sur le

métabolisme d'accrétion et de résorption osseuse pendant la lactation et le début de la gestation suivante.

Pour ce projet 24 truies gestantes seront mobilisées entre les 2 semaines précédant la mise-bas et les deux-tiers de la gestation suivante, soit 17 semaines de suivi par truie. Pendant toute la durée du suivi, les truies seront logées, alimentées et conduites (mise-bas, lactation et insémination) selon les pratiques usuelles en élevage porcin et selon les normes en vigueur. Le projet nécessitera en plus les mesures et les prélèvements suivants. Environ 24 heures après la mise-bas, la taille des portées sera standardisée entre les truies par l'intermédiaire d'adoption entre truies du même lot expérimental. Les porcelets ainsi que les truies seront régulièrement pesés. L'épaisseur de gras dorsal des truies sera régulièrement mesurée par ultra-sons. Des échantillons de sang seront prélevés à 3 reprises sur chaque truie par prise de sang. Du lait sera prélevé sur les truies à deux reprises sur chaque animal à l'aide d'une injection intramusculaire d'ocytocine. Des prélèvements d'urine seront réalisés à 8 reprises par prélèvement direct lors de la miction à la levée des animaux le matin. Des prélèvements de fèces seront réalisés à 4 reprises par prélèvement d'échantillons dans les cases de maternité. La mobilisation osseuse des truies sera suivie grâce à l'analyse de biomarqueurs de l'accrétion et de la résorption osseuse au niveau urinaire et sanguin. L'effet du BE sur les régulations acido-basique des truies sera suivi grâce aux prises de sang.

Le schéma statistique du projet consistera en trois répétitions impliquant 8 truies chacune. A chaque répétition, les truies seront réparties dans deux lots recevant deux niveaux de BE différents. Les données seront analysées par analyse de variance selon un modèle statistique incluant les effets du niveau de BE et de la répétition.

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux pour étudier l'effet de l'alimentation minérale sur le déroulement des mises-bas, l'amplitude des cycles de mobilisation/reconstitution osseuse et le métabolisme calcique des truies.

Réduire : Le schéma expérimental totalement randomisé nécessite pour répondre aux objectifs scientifiques avec suffisamment de puissance statistique, un effectif minimum de 12 truies par traitement. Ceci a été testé au préalable au vu des réponses attendues.

Raffiner : La conduite d'élevage sera respectueuse des animaux. Un suivi régulier du comportement des animaux sera mis en place pour détecter le plus rapidement possible tout signe de souffrance ou de douleur. Des points limites adaptés ont été définis afin d'éviter au maximum toute forme de souffrance des animaux.

7583 Une nette augmentation des allergies alimentaires est observée dans les pays industrialisés depuis une vingtaine d'année. Il s'agit d'une réponse immunitaire inappropriée contre certains constituants inoffensifs des aliments, les protéines, qui devraient normalement être tolérées par l'organisme. L'allergie alimentaire résulte ainsi de l'absence d'une tolérance immunitaire qui est normalement induite contre ces protéines ingérées. C'est cette tolérance que l'on cherche à rétablir au cours des protocoles de « désensibilisation » des allergies.

Parmi les allergies alimentaires, l'allergie au lait de vache touche 2 à 3% des enfants dans les premières années de vie. Celle-ci disparaît de plus en plus tardivement et prédispose à d'autres formes d'allergies, tel que l'asthme. La prévention et le traitement rapide de ce type d'allergie apparaissent donc essentiels. La prise en charge des enfants allergiques au lait de vache repose sur l'utilisation d'hydrolysats intensifs de protéines du lait, qui sont constitués de protéines découpées en tous petits morceaux et qui n'ont donc plus la capacité de déclencher une réaction allergique. Pour les enfants les plus réactifs, des mélanges d'acides aminés, aliments complètement artificiels, peuvent être proposés. Ces formules, dont le coût est élevé, n'ont pas comme objectif de guérir la maladie, mais juste d'éviter l'apparition de symptômes allergiques. En amont, chez les enfants à risque allergique élevé du fait d'une histoire familiale d'allergie, des hydrolysats partiels peuvent être proposés pour prévenir le développement d'une allergie au lait de vache.

Le but de ce projet est d'évaluer le potentiel d'ingrédients qui, ajoutés aux hydrolysats intensifs de laits de vache, permettraient de prévenir et/ou d'aider à la guérison de l'allergie aux protéines du lait de vache en induisant/restaurant de façon efficace la tolérance immunitaire. En amont, l'évaluation du risque que les formules provoquent une réaction chez un enfant allergique (allergénicité résiduelle)

sera réalisée à l'aide de tests alternatifs *in vitro*. Ceux-ci permettront de réaliser une première sélection des produits à tester et donc de limiter le nombre d'animaux en expérimentation.

Cependant, aucun modèle *in vitro* n'est disponible pour tester l'efficacité préclinique de telles formules et ingrédients et d'en comprendre les mécanismes. Ainsi, cette évaluation requiert l'utilisation d'un modèle animal qui reproduira la dégradation gastro-intestinale des constituants des formules, leur passage de la barrière intestinale puis leur prise en charge par le système immunitaire pour l'induction d'une réponse immunitaire spécifique. L'effet de cette réponse pour prévenir ou guérir une allergie aux protéines du lait de vache pourra être ainsi analysé.

L'efficacité des formules ne montrant pas d'allergénicité résiduelle sera ainsi testée grâce à un modèle expérimental d'allergie alimentaire induite chez le rongeur. Dans ce modèle, l'allergie est induite par administration orale de lait de vache en présence d'un adjuvant pro-allergique. L'intensité de l'allergie induite, et sa modulation par les formules, sera analysée par la mesure des anticorps et de différents paramètres biochimiques présents dans le plasma, et par l'analyse de différents paramètres cellulaires mesurés après l'euthanasie des animaux. Il s'agit d'un modèle et de marqueurs classiquement utilisés et validés, pour lequel il n'y a pas de souffrance de l'animal. Les formules seront administrées sous formes liquides, avant ou après l'induction de l'allergie, à des doses telles que celles ingérées par un enfant et à l'aide de sondes adaptées aux rongeurs.

Le nombre de 1050 rongeurs, avec 10 individus par lot de traitement correspond au minimum nécessaire à l'analyse statistique des données et permettre ainsi l'exploitation et l'interprétation scientifique des résultats. Deux séries de procédures expérimentales seront réalisées, la première permettant d'évaluer jusqu'à 10 ingrédients d'intérêt à 4 doses dans des protocoles de prévention. Une sélection objective des produits sera réalisée à l'issue de cette procédure, afin de tester jusqu'à 5 ingrédients les plus efficaces dans des protocoles thérapeutiques, permettant de limiter le nombre total d'animaux.

Les rongeurs, issus d'un établissement fournisseur agréé, seront hébergés en groupe pour respecter leur mode de vie, et les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre. L'état de santé des animaux sera contrôlé et suivi lors de toute manipulation, et au minima hebdomadairement, par une équipe formée et soucieuse du bien-être animal, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée à la moindre détection d'un signe de souffrance (arrêt de l'expérimentation en cas de souffrance de l'animal).

7584 Le porc est une espèce polytoque et les porcelets naissent nombreux et relativement immatures. De ce fait, la période postnatale et celle du sevrage sont en élevage porcin des périodes à risques pour la santé des porcelets au cours desquelles l'utilisation de substances médicamenteuses comme des anti-infectieux sont encore utilisées et ce malgré des efforts substantiels de la filière porcine pour en réduire l'utilisation. En effet, depuis quelques années, la recherche d'alternatives aux traitements anti-infectieux a mobilisé les différents acteurs de la filière afin de répondre à l'enjeu du plan Ecoantibio 2017 prévoyant une réduction de l'utilisation des anti-infectieux de 25%. Parmi ces alternatives figurent les solutions préventives visant à favoriser le développement et la maturité du porcelet le plus précocement possible en intervenant sur l'alimentation de la truie. Ces solutions visent à agir sur la santé et l'équilibre de la truie qui transmettra un lait et/ou un microbiote donnant aux porcelets une protection jusqu'au sevrage et au-delà.

L'objectif de ce projet est de mener un essai pour déterminer si l'ajout d'un ingrédient dans l'aliment des truies pendant la gestation et la lactation peut contribuer à préserver la santé des porcelets pendant la phase de lactation et au sevrage. Deux ingrédients de nature différente et de mode d'action différent, fournis séparément aux truies, vont être testés en collaboration avec 2 partenaires de l'alimentation animale.

L'approche visant à établir la preuve de concept du rôle de l'aliment de la mère sur la santé et la robustesse des porcelets ne peut être réalisée que sur des animaux vivants (Remplacement) dans des conditions d'élevage contrôlées (Raffinement).

Cet essai inclura au total 780 animaux. L'essai porte sur 3 groupes de 20 truies et leur portée jusqu'à 5 semaines après le sevrage : un groupe témoin commun aux deux ingrédients (Réduction), un groupe recevant l'ingrédient 1 et le 3ème groupe l'ingrédient 2. Les ingrédients seront incorporés dans

l'aliment des truies pendant la gestation et le début de la lactation. Les porcelets seront sevrés à l'âge de 4 semaines et les observations poursuivies jusqu'à 5 semaines après le sevrage. Les performances (pesées régulières) et la santé des truies et des porcelets seront enregistrés tout au long de l'essai. Des prélèvements de fèces seront effectués sur les truies et 3 porcelets représentatifs par portée pour étudier le transfert du microbiote de la mère aux porcelets. Des prélèvements de colostrum et de lait seront effectués sur les truies pour en établir la composition nutritionnelle et en immunoglobulines. Enfin, un nombre limité (Réduction) de prises de sang seront réalisées sur les truies (3 prises de sang en début de gestation et de lactation, et au sevrage des porcelets) et sur 2 porcelets par portée (avant le sevrage et 1 semaine après le sevrage) pour la mesure d'indicateurs du statut métabolique et de la santé (Raffinement). L'ensemble des procédures et des observations sera effectué par du personnel expérimenté (Raffinement).

7585 L'hypospadias touche 1 homme sur 500 à la naissance. C'est une malformation fréquente qui associe une couture de la verge, un défaut de fermeture ventrale du prépuce et un méat urétral non apical. Cette malformation peut être prise en charge chirurgicalement afin de rétablir des fonctions urogénitales normales et un aspect esthétique acceptable. Il existe de nombreuses techniques chirurgicales différentes, mais toutes sont confrontées à la difficulté de maintenir une lumière urétrale ouverte et une compliance urétrale s'adaptant à la croissance de l'organe pendant le développement de l'enfant. Les techniques disponibles incluent la mise en place d'urètre artificiel (matrice de collagène, lambeaux) et l'utilisation de plasma enrichi de facteurs plaquettaires. Ces chirurgies sont malheureusement grevées de complications cicatricielles récurrentes nécessitant de multiples interventions : fistules (7,5%), sténoses (4%), déhiscences cicatricielles complètes (2,5%).

Le but du projet est donc de diminuer le risque de complications mineures et majeures liées à l'acte chirurgical. Pour cela, une nouvelle technique de chirurgie urétrale basée sur l'implantation d'un biomatériau cellulaire sera mise au point et optimisée chez le lapin.

Pour développer cette technique, des cellules stromales du tissu adipeux (ASC) autologues seront utilisées, ces ASC étant dotées de propriétés régénératives, immunomodulatrices (anti-inflammatoires, antifibrotiques) connues dans la reconstruction tissulaire. Le résultat attendu est une amélioration de la cicatrisation, une diminution des complications associées et un maintien de l'intégrité urétrale morphologique et fonctionnel. Une fois cette technique maîtrisée et ses bienfaits démontrés, elle pourra être transposée chez l'enfant, afin de limiter le nombre de reprises au cours de la croissance des sujets opérés.

Les chirurgies urétrales seront effectuées chez des lapins de souche néozélandaise. Trente lapins mâles seront utilisés au total. Dans une première partie, une étape de mise au point et d'optimisation du modèle sera réalisée incluant : l'adaptation de la technique chirurgicale, le prélèvement de tissu adipeux ainsi que l'extraction et la culture des ASC de lapin avant intervention urétrale. Dans un second temps, d'autres lapins seront utilisés pour démontrer les preuves du concept (bénéfices morphologiques et fonctionnels) ; ces preuves seront apportées par des observations : cliniques, radiographiques et histologiques. Ces lapins seront comparés à des témoins, les témoins étant des lapins qui seront opérés avec des biomatériaux sans cellules.

Pour démontrer les effets bénéfiques attendus (diminution de l'inflammation, des fistules, sténoses... et les remaniements tissulaires positifs durables dans le temps), seul un modèle intégré peut être utilisé. Le lapin étant couramment décrit pour ce type de chirurgie, il reste la meilleure espèce pour effectuer des comparatifs. De plus, conformément au décret 2013/118, le nombre de lapins a été réduit au maximum pour pouvoir effectuer des tests statistiques robustes. Les animaux auront une prise en charge maximale de la douleur (anesthésie, analgésie) et leur bien-être sera maintenu tout au long de leur hébergement par un fond sonore, l'utilisation de lampes chauffantes, de foin, de tapis de réveil après les anesthésies, etc.

7586 La cornée est l'organe le plus greffé dans le monde. Les pathologies endothéliales sont toujours associées à une baisse importante de la densité cellulaire endothéliale (DCE) liées au manque de capacité proliférative des cellules endothéliales cornéennes (CECs) *in vivo*.

Une baisse importante de la DCE engendre une perte de transparence cornéenne qui ne peut être rétablie que par la réalisation d'une greffe de cornée. A cause de l'inefficacité des processus de

réparation tissulaire, l'endothélium cornéen a longtemps été considéré comme un tissu non régénératif.

Nous avons récemment publié une étude qui a soulevé une polémique sur l'existence de la régénération de l'endothélium cornéen chez adulte. Nos premières observations suggèrent que des cellules souches/progénitrices situées à l'extrême périphérie de l'endothélium cornéen pourraient être à l'origine d'une régénération très lente de CECs *in vivo* chez adulte compensant ainsi la diminution de la DCE (surtout à la périphérie de l'endothélium). Ces travaux ont besoin d'être poursuivis afin d'obtenir plus de résultats.

Le 5-Ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU) est un nouvel analogue de la thymidine (un des éléments principaux de l'ADN) qui entre en compétition avec cette dernière lors de son incorporation à l'ADN au sein de cellules en division. Il remplace ainsi la Bromodeoxyuridine (BrdU) avec l'avantage d'une révélation plus facile techniquement. L'injection d'EdU chez lapin suivie d'une fenêtre de 45 jours ou plus sans injection peut être utilisée pour pré-sélectionner des cellules souches *in situ* grâce à son cycle cellulaire très long. Notre première approche sera d'injecter de l'EdU chez de jeunes lapins dans le but d'identifier et localiser pour la première fois les cellules souches/progénitrices spécifiques à l'endothélium.

Le lapin est difficilement remplaçable dans ce projet qui doit se faire obligatoirement en *in vivo*, il est donc impossible éthiquement de mettre en place un tel projet chez l'homme mais aussi c'est le seul animal à avoir les deux critères suivants : proche morphologiquement de l'homme et forte capacité de régénération endothéliale, qui sont deux critères théoriques obligatoires pour que l'expérience soit un succès.

Au total, 16 lapins sont potentiellement prévus pour ce projet. Ce nombre est réduit au minimum pour que les résultats soient statistiquement significatifs et prend en compte le risque que certains animaux peuvent être exclus du projet.

Tout est mis en œuvre pour limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal (anesthésie générale et dispositif chirurgical stérile pour l'injection et l'opération, suivi quotidien dans la semaine suivant l'opération, critères d'évolutions négatifs claires de la cicatrisation définissant les cas où un traitement spécifique sera administré à l'animal), des points limites ont été clairement mis en place afin d'éviter toutes souffrances inutiles à l'animal afin de le sortir le plus rapidement possible de l'expérimentation et donc de le soulager (perte de poids rapide, automutilations sévères, signes cliniques d'infection oculaire persistante malgré les traitements appliqués).

Par ailleurs, les lapins sont hébergés en cage réglementaire (plateforme paroi transparente entre 2 cages); dans un environnement enrichi (kong et autre jeux). Enfin, l'eau et la nourriture (granules et foin) sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

7587 Les pathologies oculaires entraînent des lésions qui peuvent affecter gravement la vision de manière irréversible. Ces anomalies sont multiples (dégénérescence maculaire liée à l'âge, rétinopathie chronique, décollement rétine, cataracte, glaucome...) et peuvent atteindre les différents segments de l'œil.

Le projet de recherche s'intéresse aux nouvelles approches thérapeutiques dans le traitement des pathologies oculaires. En particulier, l'objectif est d'évaluer de nouveaux dispositifs médicaux et techniques chirurgicales visant à restaurer la vision. L'implantation chez le gros animal permet de respecter les contraintes anatomiques trouvées chez l'homme et ainsi de valider dans ces conditions la tenue et le fonctionnement du dispositif.

Le projet prévoit le recours à des modèles porcins et canins justifiés par une taille et une fonction oculaires proches de ceux de l'Homme, avec au maximum respectivement 80 et 40 individus. Le nombre d'animaux a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Les procédures expérimentales sont classées modérées à sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de

prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires afin de garantir le bien-être animal.

7588 Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines » reflétant les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Afin d'améliorer le traitement de ces PTCL, il est important de développer des modèles permettant de mieux comprendre les mécanismes de transformation des lymphocytes T mais aussi les facteurs nécessaires à la survie des cellules lymphomateuses. Ces études devraient ainsi permettre de développer de nouvelles approches thérapeutiques de ces pathologies incurables à ce jour.

Nos travaux récents réalisés dans un modèle de souris révèlent que la transformation tumorale de ces lymphocytes T est induite par la stimulation chronique de leur récepteur à l'antigène.

Afin d'améliorer le traitement de ces PTCL, nous souhaitons étudier dans notre modèle les mécanismes responsables de la survie des cellules lymphomateuses après transformation et notamment le rôle de l'interaction entre les cellules lymphomateuses et leur microenvironnement.

Le développement de modèles animaux est indispensable à l'étude des mécanismes concourant à la survie des cellules lymphomateuses et notamment leur interaction avec leur microenvironnement. La complexité de ces mécanismes n'est pas reproductible *in vitro* et justifie le recours à un modèle animal.

Pour analyser les mécanismes impactant la survie cellulaire, nous analyserons l'état d'activation des voies de signalisation en aval des récepteurs d'intérêt des cellules tumorales *in vivo* puis nous utiliserons soit des inhibiteurs pharmacologiques afin d'inhiber la signalisation en aval de ces récepteurs, soit des anticorps bloquant l'activation de ces récepteurs soit enfin nous invaliderons génétiquement l'expression de ces récepteurs.

Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant des études sur les facteurs de survie des PTCL et il est important de comprendre en particulier le rôle du microenvironnement tumoral dans ces mécanismes de survie des cellules lymphomateuses. Il nous faut donc développer de nouveaux modèles animaux permettant d'aborder ces différents aspects. Pour cela la souris est très utile car nous disposons de modèles génétiquement modifiés permettant d'étudier les mécanismes mis en jeu. Des points limites ont été définis et décrits pour éviter toute souffrance animale. Ici nous allons procéder de façon séquentielle, ainsi la réalisation d'une procédure dépendra des résultats de la procédure précédente, de manière à réduire au maximum le nombre de souris impliquées dans le projet.

Au maximum 1121 souris seront nécessaires pour ce projet.

7589 Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des cancers des lymphocytes T, ce sont des cancers hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des différents lymphomes chez l'Homme. Les causes exactes de l'origine des PTCL restent encore inconnues. Dans l'organisme, les cellules coopèrent entre elles, envoient et reçoivent des signaux permettant leur activation, croissance ou mort. La signalisation via le récepteur des cellules T (T cell receptor ou TCR) est le mécanisme principal de régulation de la croissance des cellules T normales. Il peut donc également conserver un rôle primordial dans la survenue et le développement des cellules T tumorales. Des évidences cliniques, génétiques et fonctionnelles étayent en effet cette hypothèse. Pour tester cette hypothèse nous souhaitons développer un modèle de « souris humanisées », avec une greffe de cellules humaines de PTCL dans des souris déficientes pour leur système immunitaire.

Nous voulons dans ce projet injecter des cellules humaines à ces souris, par différentes voies, afin de favoriser le développement d'un lymphome. En cas de développement d'un PTCL, des inhibiteurs ciblant la voie de signalisation du TCR seront testés.

Le développement de modèles animaux est indispensable afin de tester de nouvelles molécules anti-tumorales telles que nos inhibiteurs du TCR. En effet, seule une étude *in vivo* permet de valider l'effet anti-tumoral d'une molécule préalablement testée *in vitro* car elle prend en compte les effets que peut avoir le microenvironnement sur le développement du lymphome. Ici nous allons procéder de façon

séquentielle, ou la réalisation d'une procédure dépendra des résultats de la procédure précédente, de manière à réduire au maximum le nombre de souris impliquées dans le projet tout en permettant une exploitation statistique des résultats. Les conditions d'hébergement et les soins donnés aux animaux sont faits dans le respect du bien-être animal, ceci afin de limiter au maximum le stress et de garantir le bien-être de chaque animal. Les méthodes utilisées dans les différentes procédures de ce projet ont été étudiées afin de réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux (par exemple les prises de sang sont non invasives, espacées dans le temps et d'un volume limité ; les injections de cellules humaines se font sous anesthésie générale, sur plaque chauffante pour maintenir l'animal à une bonne température corporelle, et les animaux reçoivent un antalgique). Une définition précise des points limites, associée à une surveillance adaptée des animaux ont également été définies afin de limiter toute souffrance animale. Au maximum, 555 souris seront nécessaires pour ce projet.

7590 Les tests décrits dans ce projet concernent le développement préclinique de produits pharmaceutiques permettant d'évaluer leur effet sur la nociception chez l'animal ou de reproduire des modèles de douleur et de tester les potentiels effets analgésiques de substances pharmacologiques.

L'ensemble des procédures utilisées dans ce projet a été caractérisée de façon extensive dans la littérature scientifique et sont mises en œuvre à grande échelle au sein de différents laboratoires spécialisés dans cette approche comportementale. Ces tests nécessitent l'utilisation d'animaux (préférentiellement les rongeurs) et ne peuvent être efficacement remplacés par des méthodes alternatives. L'utilisation d'animaux vivants est justifiée par le fait que les modèles décrits dans ce projet visent à étudier les effets de substances pharmacologiques sur la réponse de l'animal à une stimulation douloureuse de façon à prédire leur efficacité clinique. Le nombre d'animaux utilisé pour chaque test a été optimisé de façon à obtenir une puissance statistique suffisante pour interpréter les résultats de façon correcte, évitant ainsi une répétition des tests. Quand la procédure et le traitement le permettent, nous réutilisons les animaux afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Compte-tenu du nombre d'animaux utilisés dans les années précédentes, nous estimons que le nombre total d'animaux qui sera nécessaire pour les 5 prochaines années sera de 8145 (5000 rats, 3000 souris, 70 cobayes, 30 lapins). Très ponctuellement, le chien ou le porc pourraient être requis (15 chiens et 30 porcs). Dans le cadre du projet, les mesures de raffinement qui s'intègrent dans la règle des 3Rs, vont consister en un suivi des points limites permettant de sacrifier précocement tout animal présentant des signes de douleur, de souffrance ou d'anxiété. Les points limites incluent : - L'aspect général, l'aspect du pelage, des yeux, la posture, les réactions de l'animal quand il est approché ou stimulé, la respiration, -L'appétit, le poids, l'état d'hydratation, -Les tremblements ou convulsions. Tous les points limites et leur notation sont décrits dans des formulaires spécifiques, en interne et permettent de prendre les bonnes décisions en évitant toute souffrance animale.

7591 L'alimentation constitue la première composante du coût de production et donc de la marge dégagée par les élevages porcins. Il faut par ailleurs préciser que c'est au cours de la phase d'engraissement que les charges liées à l'alimentation sont les plus lourdes pour les élevages porcins (durée de la période, quantité d'aliment consommé par les animaux, ...).

Il est donc primordial d'optimiser les performances des animaux pendant cette phase, ce qui va logiquement passer par une connaissance fine des besoins nutritionnels des animaux mais également par une description précise des matières premières constituant la ration des porcs charcutiers. Par exemple, la description précise du besoin en protéine des porcs va permettre d'apporter la juste quantité de protéine dans l'aliment et va donc parallèlement permettre de réduire de manière conséquente la quantité d'azote excrétée par les animaux. De plus, cette description précise des besoins protéiques du porc pourra se solder par une amélioration des conditions d'ambiance dans l'élevage (qualité de l'air, ..) et donc par une amélioration de l'état de santé global de l'animal. L'amélioration de nos connaissances sur les besoins nutritionnels des animaux aura donc des impacts positifs à la fois sur le bien-être des porcs mais également sur l'environnement.

Dans un contexte de crise, l'optimisation des performances permet d'améliorer la marge sur coût alimentaire de l'éleveur, ce qui lui permettra de pérenniser son élevage.

Ce projet aura donc pour objectif d'évaluer différentes stratégies nutritionnelles permettant de définir les besoins nutritionnels, d'optimiser les performances zootechniques et la santé du porc charcutier afin de répondre aux enjeux économique, environnemental et sociétal auxquels la filière porcine doit répondre.

Ces stratégies devront être applicables en élevage que ce soit d'un point de vue technique (faisabilité) et d'un point de vue économique. Le projet visera donc à étudier l'influence de divers facteurs sur les performances de croissance des porcs charcutiers. Ces facteurs comprendront notamment des modifications de la composition des aliments distribués aux animaux, la mise en application de différentes techniques d'élevage liées à la distribution de l'aliment (rationnement, nombre de repas) ou liées aux conditions environnementales (température). Ce projet sera réalisé chez le porc charcutier, espèce cible, pendant la période d'engraissement et donc pesant approximativement entre 25 et 100 kg de poids vif (soit une durée d'environ 70 jours). En effet, des spécificités biologiques d'espèce existent (régime alimentaire, croissance, comportement alimentaire) rendant impossible l'utilisation d'autres espèces comme modèle. De plus, la complexité des paramètres étudiés (métabolisme, comportement alimentaire,.) et leurs interactions ne permettent pas d'utiliser des modèles alternatifs (modélisation, études *in vitro*).

Le projet aura une durée de 5 ans, inclura 840 porcs et permettra de faire 15 essais avec 56 animaux par essai. 91% des animaux resteront dans le circuit commercial classique. 56 animaux est le nombre minimal d'individus permettant de mettre en évidence des différences significatives entre les stratégies nutritionnelles étudiées (2 à 5 %). Pour chaque essai, 4 stratégies seront comparées. Une seule procédure expérimentale sera mise en place dans le projet. Elle comprend le logement individuel des animaux ainsi que des prélèvements de sang et de fèces en complément du suivi des performances de croissance des animaux (poids, consommation d'aliments). Le logement individuel permet d'améliorer la qualité/précision d'enregistrement des mesures, d'adapter l'alimentation à chaque animal et donc parallèlement de réduire le nombre d'animaux impliqués dans le projet. Les prises de sang et les prélèvements de fèces pourront être effectués sur un sous-groupe d'animaux, la variabilité entre les individus étant inférieure pour les paramètres physiologiques comparativement à celle observée pour les performances. Le nombre d'animaux impliqués dans les prélèvements de sang et de fèces sera rigoureusement estimé afin de réaliser les collectes sur le nombre minimal d'individus permettant de mettre en évidence un éventuel effet du traitement appliqué sur les paramètres biologiques recherchés (glycémie, digestibilité). De plus, plusieurs méthodes seront mises en œuvre afin d'améliorer le bien-être général des animaux : enrichissement des cases avec des objets manipulables par les porcs et contacts olfactifs/visuels entre animaux possibles.

7592 Le contexte dans lequel se place ce modèle est celui de la maladie rénale chronique. Ainsi que le montre la dernière étude l'incidence et la prévalence de la maladie rénale chronique (MRC) ne cesse d'augmenter de par le monde. La MRC est, parmi les maladies non transmissibles entraînant une cause de décès prématuré, celle qui a le plus augmentée entre les années 1990-2013. L'évolution lente, progressive et inéluctable vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) fait que la MRC devient un problème socio-économique majeur. L'IRT se caractérise par l'accumulation progressive de fibrose c'est à dire l'accumulation des protéines de la matrice extracellulaire (principalement des collagènes) dans l'interstitium rénal. A ce jour seul les inhibiteurs de l'enzyme de conversion semblent ralentir la progression de cette fibrose et il n'existe toujours pas de molécule antifibrosante. Notre équipe s'intéresse essentiellement au diabète et plus précisément à la néphropathie diabétique qui est la cause majeure de l'IRT dans le monde. Un des axes de notre laboratoire s'intitule « thérapies innovantes » et l'objectif majeur de cet axe est l'étude des plantes, provenant de la biodiversité de l'île de La Réunion, inscrites à la pharmacopée française. Notre laboratoire a isolé à partir de certaines de ces plantes des molécules (polyphénols) ayant des propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. A notre connaissance aucune étude n'a été effectuée pour étudier le potentiel néphroprotecteur notamment anti-fibrosant de ces molécules au niveau rénal dans le contexte de la néphropathie diabétique. Afin de mimer au plus près la pathologie humaine nous utiliserons un modèle de souris diabétique chez qui un des deux reins sera enlevé par chirurgie. Ce modèle de néphrectomie unilatérale chez des souris spontanément diabétiques est couramment utilisée chez les rongeurs pour accélérer l'apparition de lésions rénales induites par le diabète. Nous évaluerons tout d'abord l'extrait polyphénolique provenant d'*Antirhea borbonica* sur la progression de l'insuffisance rénale au niveau

fonctionnel et tissulaire et si un effet néphroprotecteur est mis en évidence nous évaluerons les effets des 3 polyphénols majoritaires (acide caféique, acide chlorogénique, kaempferol) de cet extrait. Comme cela a déjà été montré, cette procédure d'uni-nephrectomie sera appliquée à une souche de souris présentant spontanément un diabète de type 2 (db/db). Ainsi nous pourrons disposer d'un modèle animal préclinique de néphropathie diabétique relevant pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques capables de prévenir, freiner, voire stopper, la progression de l'insuffisance rénale chronique.

Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la néphropathie diabétique est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. En effet nous avons besoin de toute la complexité vasculaire et inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine. Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire (micro-chirurgie, doses injectées, durée du traitement). De plus les traitements seront administrés de la façon la moins invasive possible (injection intrapéritonéale ou gavage).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (micro-chirurgie, mode et volume d'injection, durée du traitement). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : l'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'information. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations animales dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

Pour ce projet nous avons fixé un plafond de 220 souris. Cent souris (50 contrôles, 50 diabétiques) pour l'étude de l'extrait de polyphénols d'*Antirhea borbonica* et 120 souris pour l'étude des polyphénols individuels (acide caféique, acide chlorogénique, kaempferol). Notons que l'évaluation des effets individuels de chacun des polyphénols majoritaires ne sera envisagée que si l'extrait de polyphénols d'*Antirhea borbonica* montre un effet néphroprotecteur.

7593 Malgré les avancées thérapeutiques, les maladies cardiovasculaires représentent aujourd'hui une cause majeure de mortalité chez l'adulte avec plus de 700 000 décès par an en Europe. La moitié de ces décès sont dus à des insuffisances cardiaques dont la prévalence ne cesse d'augmenter en raison du vieillissement de la population. Les patients insuffisants cardiaque développent dans 50 % des cas des fibrillations ventriculaires fatales menant à la mort subite. L'insuffisance cardiaque est un syndrome complexe, associé à un profond remodelage structurel et électrophysiologique. L'origine de ces dysfonctionnements mécaniques, électriques et métaboliques reste à explorer afin de comprendre les facteurs déclencheurs de la mort subite.

L'objectif du présent projet est de comprendre comment des modifications du rythme cardiaque peuvent être associées à des changements électrophysiologiques pro-arythmiques. Le projet est réalisé chez le porc et le mouton dans l'objectif bien précis de caractériser les modifications électrophysiologiques dans des modèles animaux (porc et mouton) ayant une physiologie cardiaque proche de celle de l'Homme pour une meilleure extrapolation des résultats expérimentaux et assurer un transfert des connaissances vers la clinique.

Ce projet vise à mieux comprendre et à caractériser le fonctionnement du cœur, que ce soit à l'échelle de l'organe, du tissu, de la cellule ou de la molécule. Un des objectifs du projet est de développer des modélisations qui pourront, une fois validées, permettre de tester différentes hypothèses sans avoir recours à l'animal. Pour arriver à cet objectif de validation, l'utilisation de l'animal reste, à ce stade,

indispensable. Les modèles utilisés (porcin et ovin) sont les modèles les plus pertinents pour l'homme (pour des raisons anatomiques, métaboliques et de conduction du signal électrique). Le modèle animal dans cette étude ne peut donc pas être REMPLACÉ par d'autres méthodes alternatives.

Le nombre d'animaux est réduit au maximum : les équipes travaillant sur différentes structures cardiaques se coordonnent et mutualisent les échantillons biologiques. Ainsi, pour un animal plusieurs études sont réalisées ce qui contribue à REDUIRE le nombre d'animaux nécessaires. De plus, des tests statistiques ont été réalisés pour déterminer le nombre minimal d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 975 porcs et 975 moutons au total pour une période de 5 ans, concernés par les 3 procédures décrites.

Les retombées scientifiques principales de ce projet seront notamment une meilleure compréhension des mécanismes de régulation de l'électrophysiologie cardiaque et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques de l'arythmie afin de prévenir la mort subite.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter le stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux respectant les spécificités de chacune des espèces utilisées (ex : comportements naturels interindividuels)
- ils disposent d'enrichissements adaptés (jouets pour les porcs (balle, chaîne, grattoir), foin et pierre à sel pour les brebis)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés : si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement.

7594 Notre processus de production assure la production d'anticorps polyclonaux (AcP) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant chacun sa spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs qui peuvent reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Les anticorps sont sécrétés par des lymphocytes différenciés après activation par l'immunogène étranger. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. La réponse humorale polyclonale résulte de la production d'anticorps sécrétés par plusieurs populations clonales ayant diverses spécificités (pour des épitopes différents, y compris ceux situés sur une même molécule), affinités et classes, et c'est donc une forme de défense efficace contre les pathogènes. Les AcP possèdent des affinités différentes pour divers épitopes et peuvent se lier à plusieurs sites différents d'un même immunogène ou antigène complexe, ce qui leur confère une excellente capacité globale de liaison. Les anticorps polyclonaux (AcP, antisérums) ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoélectromicroscopie.

Les antisérums sont généralement produits par injection à un animal de l'immunogène (antigène) cible, souvent combiné à un adjuvant qui accroît la réponse immunitaire. La réponse immunitaire peut

par la suite être amplifiée par des injections de rappel d'antigène avec ou sans adjuvant. On prélève des échantillons de sang de l'animal pour évaluer le niveau de production d'anticorps (évaluer la réponse immunitaire) ; lorsque le titre est suffisamment élevé, on prépare un antisérum en effectuant une prise de sang suivie de l'isolement du sérum.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : remplacement de l'adjuvant complet de Freund).

L'espèce qui sera utilisée pour la production d'AcP est choisie avec soin. Nous prenons en compte les facteurs suivants :

- 1) la quantité nécessaire d'anticorps ou d'antisérum (choix d'animaux de plus grandes tailles lorsqu'on a besoin de grandes quantités d'anticorps);
- 2) la relation phylogénétique entre l'espèce d'où provient l'antigène protéique et l'espèce utilisée pour produire l'anticorps;
- 3) la fonction effectrice des AcP provenant de l'espèce productrice d'anticorps;
- 4) l'utilisation prévue des anticorps.

La production d'AcP chez le rat est particulièrement adaptée aux projets pour lesquels une qualité d'anticorps est requise, tout en limitant le nombre d'animaux à engager dans les programmes de production ainsi que la durée des protocoles. En se basant sur le nombre moyen de protocole et d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 100 protocoles, représentant 200 rats.

Le temps minimum d'immunisation est de 60 jours.

Dans la production d'AcP, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période. Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère à modéré en fonction de l'adjuvant utilisé. Nous utiliserons prioritairement les protocoles d'immunisation ayant le moins d'impact sur la santé des animaux. Les animaux sont surveillés tous les jours ouvrés et plus particulièrement durant les premières heures juste après l'immunisation.

Les rats sont hébergés en groupe dans des cages adaptées afin de maintenir leur sociabilisation. Des objets d'enrichissement (rouleau en carton,...) sont placés dans les cages afin de stimuler l'activité des animaux.

7595 Nous sommes de plus en plus confrontés à la problématique de santé publique liée à la résistance aux traitements spécifiques de pathologies. Cette résistance aux médicaments que l'on appelle Mononuclear Phagocyte System se traduit par la diminution de l'efficacité du principe actif pour soigner une maladie ou diminuer les symptômes chez le patient. Dans le but d'optimiser les effets thérapeutiques des médicaments utilisés en chimiothérapie, Nous voulons mettre en évidence l'intérêt de l'encapsulation du médicament (Principe Actif P.A.) dans des nano micelles. Les nano micelles vont permettre de masquer la charge du principe actif et d'augmenter sa concentration intracellulaire afin d'assurer l'efficacité du traitement. Des études préliminaires ont montré la stabilité de la formulation et le relargage progressif du médicament *in vitro*. Afin de valoriser ces nouvelles formulations à visée thérapeutique, des études précliniques sur des modèles animaux doivent impérativement être entreprises. L'étude consistera à mettre en évidence l'effet thérapeutique amélioré par l'encapsulation de 4 principes actifs (4 leads utilisés en chimiothérapie des cancers) dans les nano micelles par rapport à l'effet des principes actifs seuls. Pour cela nous utiliserons un modèle murin de xénogreffe d'une lignée tumorale pancréatique humaine induit en sous cutanée. C'est à dire que nous grefferons en sous cutané des cellules tumorales de cancer de pancréas humain sur des souris. Nous comparerons les résultats obtenus sur l'évolution tumorale en mesurant 2 fois par semaine durant 8 semaines la taille des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse d'une part, et une fois toutes les deux semaines grâce à l'imagerie TEP (tomographie à émissions de positons) par injection de glucose radio-marqué (18FDG) connu pour se fixer sur les tumeurs d'autre part. Cette

étude nécessitera 10 souris par groupe x 8 groupes (4 PA seuls et 4 PA encapsulés) + 10 souris x 2 groupes contrôles (sérum physiologique et nano micelles seules) ce qui fait 100 souris au total. Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant de réaliser des études. Pour répondre à la problématique, nous sommes obligés d'étudier nos produits thérapeutiques sur des animaux. En effet nous avons besoin de tester la biodisponibilité et le bon ciblage des produits non encapsulés versus encapsulés via des injections similaires de ce qui serait fait chez l'homme.

Raffinement : les souris sont placées dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les animaux sont nourris ad libitum et toute manipulation invasive sera précédée d'une anesthésie générale sous isoflurane à 2%. Nous avons choisi des points limites clés qui permettent de prévenir une détérioration de l'état clinique général de l'animal dans le but d'éviter quelque souffrance.

7596 Grâce à ses nombreuses qualités organoleptiques, zootechniques et économiques, la perche Eurasienne *Perca fluviatilis* est une espèce intéressante pour la diversification de l'aquaculture continentale européenne. Pour contrôler la reproduction de cette espèce, il existe des programmes photo-thermo-périodiques. En particulier, la hausse de la photopériode avant la ponte est couramment utilisée par les pisciculteurs pour induire l'émission des gamètes. Ces habitudes reposent sur des connaissances empiriques basées sur les variations naturelles de la photopériode mais sans validation scientifique et technique. Ce projet de recherche vise à approfondir les connaissances sur l'influence de la quantité de lumière reçue en fin de cycle de reproduction sur la qualité des œufs de perches.

La mélatonine, communément appelée hormone du sommeil, est une hormone dont la production est sous le contrôle de la lumière et dont le principal rôle est l'entraînement des rythmes circadiens (activité locomotrice, activités métaboliques, pigmentation, ...) et circannuels (reproduction, croissance). Plusieurs études démontrent, chez les poissons, un contrôle de la reproduction par la mélatonine. Cette hormone pourrait ainsi jouer un rôle essentiel dans l'interaction entre l'environnement lumineux, l'axe hormonal de la reproduction et la qualité des œufs produits par les femelles. Dans ce projet, ces interactions seront étudiées à travers les effets de la photopériode avant la ponte sur la capacité de reproduction de la perche.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer les effets de différentes durées de photophase sur la reproduction de la perche femelle. À cette fin, des stocks de perches ont été soumises à des variations naturelles de température et de photopériode pendant 10 mois afin d'induire leur puberté, la croissance de leur gonade et pour permettre leur reproduction. A la fin de ce programme photothermo-périodique, les femelles seront divisées en 3 groupes caractérisées par une durée de la photophase variable (0 ou 8 ou 16 heures de lumière par jour, procédure 1). Après 1 semaine d'acclimatation sous cette photopériode constante, deux injections d'hormones successives seront réalisées (procédure 2) en vue d'induire l'ovulation et la ponte par stripping (procédure 3) quelques jours plus tard.

Afin de répondre aux objectifs, 160 poissons mâles et femelles seront utilisés. Plus précisément, 50 individus seront prélevés à chaque temps de prélèvement (prise de sang : procédure 4) et euthanasiés pour évaluer les paramètres physiologiques liés à la reproduction. Des individus supplémentaires (160-50 = 110) seront utilisés en vue de produire du sperme (80 mâles) et afin d'optimiser le bien-être des poissons car une densité beaucoup trop faible est défavorable pour le comportement des espèces grégaires comme la perche. Ces individus supplémentaires seront gardés en vie à la fin de l'expérimentation.

Le nombre de poissons par groupe a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique suffisante et nécessaire pour obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (Réduction). Le Remplacement par des méthodes cellulaires ou moléculaires est impossible à ce stade au vu de la complexité des interactions que nous visons d'étudier ici. En vue de limiter l'impact de cette expérience sur les organismes, les prélèvements de sang se feront après anesthésie et les prélèvements des organes cibles seront effectués après euthanasie. Et, tout au long de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et toute souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (Raffinement).

7597 Les maladies cardio-vasculaires représentent l'une des premières causes de mortalité dans tous les pays industrialisés. En France, environ 120 000 personnes subissent un infarctus du myocarde, chaque année. Malgré une amélioration de la prise en charge de la crise, 10% décèdent rapidement et 18 000 personnes mourront dans l'année. De nouveaux médicaments sont nécessaires pour le traitement de la phase aiguë et pour la prévention des conséquences à long terme, à savoir le développement progressif d'une insuffisance cardiaque congestive.

Dans le cadre de l'insuffisance cardiaque, la mesure du débit cardiaque fournit une indication majeure dans l'évolution de la pathologie. Il est donc nécessaire en complément des mesures de la contractilité cardiaque d'avoir une mesure effective de ce paramètre (débit cardiaque), témoin absolu de la fonctionnalité du cœur.

Ce projet décrit la mise au point de la mesure du débit chez le rat vigile sain qui s'intégrera à notre stratégie d'évaluation du potentiel thérapeutique de nouveaux traitements de l'insuffisance cardiaque basée sur l'utilisation de modèles rongeurs.

L'utilisation d'un animal vigile et libre de ses mouvements permet de mesurer les effets propres des substances d'essai sans interférence chimique avec un anesthésique.

De plus, l'obtention du débit cardiaque associée à la mesure des paramètres de pressions par télémetrie (technique permettant la mesure de paramètres physiologiques, en particulier cardiovasculaires, à distance, sur animal non restreint), permettra d'établir un profil cardiovasculaire complet des composés sur l'animal vigile.

Dans le domaine de l'insuffisance cardiaque, la recherche de nouveaux traitements est initiée *in vitro*, sur des cellules humaines d'intérêt (cardiomyocytes, cellules endothéliales, cellules musculaires vasculaires...). Elle a pour objectif de fournir des indications sur la manière dont les nouveaux produits agissent sur les mécanismes/cibles impliqués dans les différentes phases de la pathologie. Cette étape permet de sélectionner les produits actifs *in vitro*. Comme aucun système cellulaire ou bio-informatique ne peut reproduire la complexité d'un organisme qui est le siège de régulations variées, complexes et pas nécessairement bien appréhendées, il devient incontournable de tester ces produits *in vivo*. Le risque d'échec *in vivo* sera limité puisque seuls les meilleurs produits actifs *in vitro* et *ex vivo* seront évalués.

Les protocoles d'études sont élaborés avec le comité d'éthique et validés par ce dernier. Les bio-statistiques jouent un rôle important : elles permettent de définir le nombre d'animaux nécessaires pour mettre en évidence des effets biologiquement significatifs en fonction de l'objectif de l'étude, du design expérimental (nombre de groupes d'animaux, type de comparaisons, présence de répétitions), de la variabilité des paramètres mesurés, et de l'historique des données. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal, et à l'observation des signes cliniques fondamentaux.

Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 500 rats sur 5 ans.

7598 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, afin de ne pas compromettre l'obtention de résultats exploitables, nous avons légèrement 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.

7599 A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques nous interdisent, à juste titre, l'enseignement initial de la chirurgie sur les patients, nous organisons des travaux pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage intégré sur le modèle porcin.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte (ou laparotomie) et par cœlioscopie (ou laparoscopie), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale et continue. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants, chirurgiens seniors) et se développent de façon progressive dans différents laboratoires.

La formation s'effectue de façon progressive et intégrée au sein :

1) du laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer, simulateur laser Green-light et simulateur robotique Da Vinci), et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) du laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens praticiens sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.

Le projet développé ici est un projet de formation par palier en chirurgie coelioscopique en gynécologie sur modèle porcin. Ce modèle est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie en laparoscopie.

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 40 animaux pendant 5 ans. De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation. Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

7600 A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques nous interdisent, à juste titre, l'enseignement initial de la chirurgie sur les patients, nous organisons des travaux pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage intégré sur le modèle porcin.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte (ou laparotomie) et par cœlioscopie (ou laparoscopie), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale et continue. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants, chirurgiens seniors) et se développent de façon progressive dans différents laboratoires.

La formation s'effectue de façon progressive et intégrée au sein de

1) le laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer, simulateur laser Green-light et simulateur robotique Da Vinci), et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) le laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens praticiens sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.

Le projet développé ici est un projet de formation par palier en chirurgie urologique sur modèle porcin. Ce modèle est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie en laparoscopie.

Dans ce projet la règle des 3R sera assurée comme suit :

Réduire : Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 260 animaux pendant 5 ans.

Remplacer/réduire : De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation.

Raffinement : Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

7601 Le cancer de côlon humain est un des cancers présentant un taux de mortalité élevé chez l'homme. Les objectifs du projet sont de tester l'impact des pressions de croissance tumorale sur l'activité des cellules souches du côlon, et de développer de nouvelles approches thérapeutiques permettant d'inhiber les processus d'induction mécano-transductionnels de la tumorigenèse colique.

L'objectif du premier volet du projet est de tester si les cellules souches répondent aux pressions mécaniques tumorigènes, et le cas échéant quel(s) autre(s) type(s) de cellules responsables de l'augmentation de la taille des cryptes intestinales y répondent en devenant hyperprolifératives.

L'objectif du deuxième volet du projet est de cibler à des fins thérapeutiques le côlon par des drogues spécifiques des voies de transduction mécano-sensibles tumorigènes associées chez des souris sauvages ou transgéniques dont la tumorigenèse est provoquée par une compression magnétique.

Les deux volets ont en commun une même technique de ciblage et de compression magnéto-mécanique produite par l'introduction d'un aimant millimétrique dans la partie dorsale de la souris suivie d'une injection intraveineuse de particules lipidiques magnétiques se localisant dans la région du côlon et induisant *in vivo* une pression équivalente à celle provoquée par la croissance d'une tumeur.

Ce projet utilisera un nombre maximal de 324 souris.

L'utilisation des souris sauvages et transgéniques comme modèles pathologiques est actuellement le seul moyen d'aborder la problématique de ce projet préclinique ayant pour but la description de

l'influence des contraintes mécaniques de croissance tumorale dans les processus d'initiation et de progression tumorale et leur traitement pharmacologique, potentiellement applicable à terme chez l'homme.

Les questions posées ne peuvent être investiguées avec des modèles cellulaires *in vitro* et requièrent une complexité tissulaire qui ne peut être récapitulée qu'*in vivo*.

Le nombre de souris pourra être réduit en fonction des résultats obtenus à chaque étape, permettant de cibler les meilleures conditions d'analyse.

Les animaux seront suivis quotidiennement et les expérimentations contrôlées de façon à minimiser et prévenir la douleur des souris. Des soins leur seront apportés après la pose sous cutanée d'aimant pour contrôler la cicatrisation. Les contraintes mécaniques de croissance tumorale précoces endogènes ont été mesurées et sont faibles, sans douleur pour l'animal.

7602 Nous formons des techniciens en biologie et leur proposons une formation des personnels amenés à appliquer des procédures expérimentales aux animaux. Ce type de formation réglementaire à l'expérimentation animale doit permettre l'acquisition de compétences théoriques et pratiques permettant la manipulation d'animaux dans le respect de leur bien-être. Conformément à l'agrément de cette formation par le Ministère de l'Agriculture, il s'agira d'enseigner aux étudiants de bonnes pratiques pour la réalisation des méthodes de préhension, de contention et d'injections chez le rat et la souris de laboratoire. Tous ces actes sont de sévérité légère pour l'animal. Pour répondre à cet objectif, les travaux pratiques que nous souhaitons réaliser permettent une familiarisation progressive des techniciens avec l'animal de laboratoire. Ils sont réalisés en effectif réduit, sous la tutelle d'enseignants et de techniciens expérimentés portant grande attention au bien-être de l'animal. Des enseignements plus théoriques d'éthique, d'éthologie, de physiologie nociceptive viennent compléter ces connaissances afin que les étudiants soient en mesure d'adapter leur pratique au comportement de l'animal qu'ils manipulent. Le choix des rongeurs s'explique par l'utilisation majoritaire de ces modèles animaux en expérimentation, les techniciens en formation étant essentiellement amenés à manipuler ces espèces dans leur entreprise. Nous formons jusqu'à 170 étudiants par an, nous aurons recours à l'utilisation maximale de 340 souris et de 340 rats pour ces travaux pratiques sur cinq années de formation. Ceci correspond à un animal de chaque espèce par étudiant, ce qui nous semble nécessaire à un bon apprentissage. Un animal surnuméraire est également prévu pour les démonstrations réalisées par l'enseignant. Cependant, afin de restreindre les effectifs animaux employés, et les actes pratiqués étant de sévérité légère, ces animaux ne seront pas euthanasiés mais seront réutilisés pour d'autres travaux pratiques se déroulant au sein de notre établissement, dans le cadre de projets autorisés, ce qui va dans le sens d'une réduction du nombre d'animaux manipulés. Lors des injections, nous veillerons à alterner les sites, de manière à éviter toute douleur liée à la répétition.

Enfin, en cas de blessure accidentelle lors d'une injection, un traitement analgésique sera prévu, fonction de la douleur observée.

7603 Les traumatismes sévères ou les résections de tumeurs osseuses nécessitent des reconstructions du squelette. L'os est le tissu le plus transplanté chez l'homme avec 1 million de transplantation chaque année en Europe. Cependant, la transplantation d'une greffe osseuse nécessite un second site chirurgical et le stock osseux du patient est limité.

Les biomatériaux à base d'os bovin sont largement utilisés pour le comblement de pertes osseuses, notamment en chirurgie maxillo-faciale. Les membranes de régénération osseuse guidée à base de collagène porcine sont également utilisées pour isoler les tissus mous de la cavité osseuse. Cependant, ces matériaux d'origine animale présentent un risque de transmission d'agents pathogènes ou de rejet immunologique.

Des études ont montrées que les substituts osseux synthétiques à base de verres bioactifs ont des propriétés d'ostéoinduction mais la régénération de défauts osseux de taille critique n'a pas été démontrée. Notre laboratoire développe une nouvelle membrane synthétique pour la régénération osseuse guidée.

L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité d'un nouveau biomatériau de substitution osseuse à base de bioverre associé à une nouvelle membrane synthétique dans un modèle de défaut mandibulaire chez le rat. Les résultats seront comparés à des biomatériaux de référence et à un défaut laissé vide (contrôle négatif). Sous anesthésie générale, un défaut osseux de taille critique (5 mm de diamètre) sera réalisé au niveau de la mandibule. Les défauts seront comblés avec des granules d'os bovin ou de bioverre synthétique et recouverts d'une membrane de régénération osseuse guidée de collagène porcine ou synthétique. Deux autres groupes sans substituts osseux mais recouverts de membrane seront réalisés. Au total 5 groupes d'animaux seront considérés. Un test de puissance statistique démontre que le nombre optimal d'animaux par groupe doit être de $n=6$, soit un total de 30 rats. L'expérimentation pourra être réalisée 2 fois pour des raisons de reproductibilité et des animaux supplémentaires utilisés. Au total 72 rats pourront être utilisés.

Après la chirurgie, les animaux recevront des injections d'analgésique et seront surveillés pendant 3 jours. Après 8 semaines, les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale. La repousse osseuse dans les défauts sera mesurée par radiographie et histologie.

7604 L'hépatocarcinome est la 6ème forme de cancer la plus répandue dans le monde. On estime que 630 000 nouveaux cas sont diagnostiqués chaque année.

Les causes majeures de HCC (HepatoCellular Carcinoma = hépatocarcinome) sont les infections virales (Hépatites C et B) et l'abus d'alcool.

Viennent ensuite les maladies auto-immunes et enfin les maladies métaboliques telle que la stéatohépatite (accumulation de graisses dans le foie) non alcoolique plus communément appelée NASH.

80% des patients atteints d'hépatocarcinome développent ce dernier à la suite d'une maladie métabolique entraînant une fibrose du foie puis une cirrhose et enfin un cancer.

Il est reconnu qu'une alimentation trop riche en graisses et en sucre associée à un mode de vie sédentaire conduit à une NASH (foie gras), qui conduit à une fibrose. La fibrose hépatique correspond à une formation excessive de matrice extracellulaire (collagène) en réaction à une inflammation du foie. Il s'agit d'un dérèglement du processus de cicatrisation destinée à remplacer les cellules endommagées. La fibrose modifie le fonctionnement du foie et peut entraîner de graves conséquences que sont la cirrhose et l'hépatocarcinome.

A ce jour, aucune molécule n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché pour le traitement de l'hépatocarcinome. L'objectif de ce projet est de démontrer l'efficacité thérapeutique de molécules dans la prévention et le traitement de cette pathologie.

L'évaluation de l'efficacité de nos molécules sera réalisée dans un modèle de rongeurs développant cette pathologie induite par un régime alimentaire enrichi en sucres et en graisses associé à l'injection d'un agent cancérigène. Le modèle décrit dans ce projet s'appuie sur une étude de la littérature scientifique. Il s'agit de mettre en évidence les propriétés préventives voire curatives de nos molécules. L'évaluation de molécules d'intérêt pour le traitement de l'HCC sera réalisée au cours des 5 années couvertes par ce projet qui comptera 9040 souris et 4520 rats.

Une première phase de sélection des meilleurs composés est effectuée sur des modèles acellulaires ou cellulaires, contribuant ainsi à l'utilisation de méthodes alternatives visant à remplacer partiellement l'utilisation des animaux comme nous le rappelle la règle des 3 R. L'évaluation finale du potentiel thérapeutique des produits dans des modèles animaux reste cependant nécessaire. En effet, l'administration des composés dans le contexte d'un animal vivant permet d'évaluer la réelle efficacité des composés dans un système biologique complexe et « global ». La fibrose hépatique menant à un hépatocarcinome est une pathologie complexe, chronique et de longue durée dans sa genèse et son développement, et la pertinence thérapeutique de nouvelles molécules est difficilement caractérisable autrement qu'avec des animaux. Les procédures utilisées sont adaptées afin d'optimiser le nombre d'animaux à engager dans les protocoles expérimentaux. En effet, en respect de la règle de la réduction, un ajustement strict du nombre d'animaux est effectué afin de maximiser les informations recueillies lors de la caractérisation et de la détermination des doses thérapeutiques optimales des composés d'intérêt. De plus, il ne sera effectué sur les animaux que le nombre strict de prélèvements sanguins, en volume et en fréquence, compatibles avec la physiologie de l'animal. Les animaux seront

sous observation quotidienne et aucun animal en détresse ou en souffrance ne sera maintenu dans cet état, il serait euthanasié par une méthode humaine adaptée le cas échéant.

7605 Cette demande de projet vient en complément d'une demande préalablement autorisée le 12/05/17.

Dans ce précédent projet nous avons travaillé sur l'étude de l'effet de l'anticorps anti-IL7R dans un modèle de réponse d'hypersensibilité retardée (DTH) chez le primate-non-humain (PNH), modèle qui permet d'évaluer de manière peu invasive les réponses immunes cellulaires et humorales chez l'homme et l'animal, ainsi que le potentiel thérapeutique et l'efficacité de nouvelles stratégies d'immunothérapie. De façon parallèle et complémentaire, et réduisant ainsi au maximum le nombre d'animaux, nous avons réalisé chez ces mêmes individus, une étude pharmacologique et pharmacodynamique (PK/PD) de l'anticorps d'intérêt.

L'interaction interleukine 7 (IL7) - IL7 récepteur (IL7-R) est cruciale pour l'homéostasie des lymphocytes T (LT). Comme ces cellules jouent un rôle essentiel dans les réponses immunes cellulaires et humorales, cette interaction IL7/IL7-R représente une cible thérapeutique potentielle pour la transplantation d'organe et le traitement de diverses pathologies auto-immunes et/ou inflammatoires chroniques, comme ceci a été démontré préalablement chez la souris. Disposant d'une expertise dans le domaine du développement des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique, notre équipe a produit un anticorps monoclonal dirigé contre l'IL7-R ou CD127 humain, ayant une activité inhibitrice sur les LT. L'équipe a par ailleurs démontré que cet anticorps possède une cross-réactivité avec les primates non-humains (PNH), mais pas avec des espèces plus éloignées de l'homme telles que les rongeurs ou le porc. Les résultats obtenus lors de la première phase du projet (une seule dose d'anticorps testée) que ce soit en DTH ou en PK /PD, nous amène à proposer une phase expérimentale complémentaire de façon à affiner l'étude pharmacocinétique et pharmacodynamique de cet anticorps chez le PNH et ce à différentes doses.

Le nombre maximum d'animaux utilisés au cours de cette étude complémentaire sera de 8. Dans un souci de respect de la règle des 3R, seule l'étude de PK/PD sera développée à des doses et voies d'injection différentes, et à ce niveau, l'étude de DTH ne sera pas refaite sur ces nouveaux animaux. La PK/PD des différentes doses sera réalisée dans un ordre décroissant de dose et la PK/PD des doses les plus faibles ne seront réalisées seulement si les résultats des doses précédentes le nécessitent.

Chaque animal sera son propre contrôle, de façon à palier d'éventuelles variations interindividuelles et les valeurs de différents paramètres sanguins et biologiques analysés après injection de l'anticorps seront comparées aux valeurs individuelles avant injection de l'anticorps, permettant ainsi d'obtenir un maximum d'informations à partir d'un minimum d'animaux.

De façon à diminuer le stress, la souffrance, et la douleur, toutes les procédures seront réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur sera donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

Les animaux seront hébergés avant le protocole expérimental en volière, de façon à préserver leur mode de vie en communauté. Au cours du protocole expérimental les individus traités seront hébergés dans des cages séparées, mais jointives permettant la vision et la communication entre congénères.

7606 A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques nous interdisent, à juste titre, l'enseignement initial de la chirurgie sur les patients, nous organisons des travaux pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage intégré chez le porc.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des techniques et des gestes opératoires à la fois par voie abdominale ouverte (ou laparotomie) et par cœlioscopie (ou laparoscopie), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale et continue. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants, infirmières d'endoscopie, chirurgiens ou gastroentérologues seniors) et se développent de façon progressive dans différents laboratoires.

La formation s'effectue de façon progressive et intégrée.

1) le laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer, simulateur laser Green-light et simulateur robotique Da Vinci) ou d'endoscopie, et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) le laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens et/ou des gastroentérologues sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.

Le projet développé ici est un projet de formation par palier en endoscopie digestive sur modèle porcin. Ce modèle est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes praticiens/ chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme, en particulier depuis l'avènement de la chirurgie en laparoscopie.

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 100 animaux pendant 5 ans. De façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation. Une grille standardisée d'évaluation des acquis des apprenants servira de référence pour justifier du nombre nécessaire de séances de formation, comprenant x procédures, pour acquérir les compétences par chaque individu et définir le nombre minimum d'animaux nécessaires à chaque formation.

Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

7607 En 1999, le Comité Permanent de la Convention Européenne pour la protection des animaux dans les élevages a recommandé que des études portant sur des méthodes alternatives à la prise forcée d'aliment chez les palmipèdes soient mises en place dans les pays producteurs de foie gras (articles 24 et 25). Depuis 2009 des essais ont été réalisés chez l'oie. Ces travaux ont consisté à exploiter le comportement d'hyperphagie (i.e. une importante prise alimentaire spontanée) observé à l'état naturel chez les oiseaux durant la période pré-migratoire pour constituer les réserves énergétiques nécessaires aux vols migratoires et ont permis de montrer que la distribution de maïs sec à volonté pendant 12 semaines, durant la période hivernale et après une phase de restriction alimentaire, associée à une réduction de la durée du jour en bâtiment obscur (de 10 à 7 h/j) durant la période automnale, permettait l'expression d'un comportement hyperphagique transitoire chez le jars, associé à un engraissement spontané très variable du foie. Une forte variabilité interindividuelle a cependant été observée sur la prise alimentaire et le poids de foie. Les travaux actuels visent ainsi à optimiser et à homogénéiser ces performances.

Ce projet a pour objectif d'explorer les mécanismes sous-jacents à l'engraissement hépatique pour un objectif finalisé d'optimisation du système de production de foie engraisé sans prise forcée d'aliment. L'implication essentielle dans la régulation de la physiologie de l'hôte de l'ensemble des micro-organismes hébergés par le tractus digestif, communément appelé microbiote digestif, a été démontrée, notamment dans la régulation de l'engraissement hépatique chez les mammifères. Le présent projet vise donc à évaluer son impact sur l'engraissement hépatique chez l'oie. Afin de répondre à cet objectif, cette étude aura recours à une technique classique d'inoculation de microbiote chez des oisons.

312 oisons seront divisés à l'éclosion en 2 lots. Le 1er sera inoculé avec le microbiote d'oies ayant répondu favorablement à une stimulation de l'engraissement hépatique spontané (poids de foie >350g) et le 2ème avec le microbiote d'oies n'ayant pas répondu (poids de foies <120g). Les inoculats (12 par lot) sont issus d'un essai antérieur ayant appliqué une stimulation de l'hyperphagie et de

l'engraissement hépatique spontané comme présenté précédemment. Les oisons seront ensuite élevés par loges de 13 animaux, avec une loge correspondant à un inoculât, selon les pratiques d'élevage usuelles puis soumises à une stimulation de l'engraissement hépatique spontané avec 1) des cycles lumineux contrôlés simulant la période pré-migratoire automnale, 2) une alternance entre restriction alimentaire de 15 à 19 semaines d'âge et alimentation à volonté par la suite et 3) un accès à un aliment riche en énergie et avec une forte appétence pour les oies, le maïs, entre 19 et 31 semaines d'âge. A 6, 19 et 25 semaines d'âge 36 animaux expérimentaux par lot (3 par loge) seront euthanasiés afin d'évaluer l'engraissement et certains paramètres physiologiques associés. A 31 semaines d'âge les animaux restant (48 par lot, 4 par loge) seront également abattus pour effectuer les mêmes mesures et analyses.

Les 312 oies impliquées dans ce projet représentent un nombre optimal d'animaux à utiliser pour observer un effet des modalités testées. En effet 3 animaux/ inoculât par date d'euthanasie représentent le minimum nécessaire pour effectuer des analyses statistiques fiables au niveau microbiologique. Des effectifs de 36 animaux expérimentaux par lot et par âge d'abattage sont ainsi nécessaires afin d'obtenir une puissance statistique suffisante. De plus, l'engraissement hépatique étant très variable (coefficient de variation de 45 à 75% dans les essais antérieurs), les effectifs sont augmentés pour la dernière date d'euthanasie à 4 animaux/inoculât, correspondant à 48 animaux par lot. Aucune procédure provoquant de la douleur ne sera appliquée aux animaux durant leur élevage. Les oies expérimentales seront élevées en logement fermé jusqu'à leur euthanasie pour contrôler la durée d'éclairage. La conduite alimentaire permettra aux animaux de couvrir leurs besoins alimentaires tout au long du protocole.

7608 En cancérologie, les patientes atteintes d'un cancer du sein avancé vont développer dans 70% des cas, des métastases à l'os. Or, très peu de choses sont connues à ce jour sur leurs mécanismes. Ces métastases sont généralement caractérisées par une destruction massive de l'os responsables de fortes douleurs, de fractures, et de compressions nerveuses pouvant entraîner des paralysies. Elles sont dans leur majorité incurables et seules des soins à visée palliatifs sont aujourd'hui utilisés.

L'objectif de ce projet est donc d'identifier un moyen de mieux connaître cette pathologie afin de pouvoir la traiter. Pour cela, nous voulons tester l'implication d'un facteur dans les mécanismes de mise en place des métastases osseuses et ceci requière l'utilisation d'animaux.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R : Pour la réduction du nombre d'animaux, les statistiques ont été employées pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Ceci nous a conduit à un calcul final de 120 animaux sur 3 ans.

Concernant le raffinement, pour réduire la douleur, toutes les précautions seront prises pour que l'animal ne souffre pas -par l'utilisation d'anti-douleurs (au cours des injections et dès que les animaux présentent des signes de douleur légère ou modérée) en aucun cas les animaux seront maintenus en vie en cas de douleur sévère. -par un environnement propre, stérile (eau, alimentation, litière) dans des cages avec couvercles filtrants qui seront continuellement mise en pièce en surpression afin d'éviter toutes infections – par un environnement enrichi des cages pour le bien-être des animaux -par l'utilisation systématique d'anesthésies (quelles que soient les procédures et avant la mise à mort) – par des temps d'acclimatation nécessaire pour diminuer au maximum le stress des animaux pouvant être engendré lors d'un changement de location (animalerie, pièce d'analyse). La température des animaux sera maintenue grâce à l'utilisation de coussins chauffants. Un gel sera appliqué sur les yeux des souris pour éviter tout assèchement de la cornée. Le niveau de propreté requis pour les procédures sera respecté. Les injections et les suivis de protocoles seront réalisés en pièce de niveau de confinement de niveau L2 sous la responsabilité du porteur de projet (Niveau 1). Tout signes de stress (comportement, activité motrice, posture) seront pris en compte ainsi qu'une pesée quotidienne sera effectuée et les valeurs reportées pour chaque animal. Un suivi journalier sera aussi effectué par le personnel animalier. Le change sera réalisé deux fois par semaine. Concernant des études de remplacement, les effets de ce facteur pouvant être locaux (tumeurs) mais aussi impacter des organes à distance (rate), cette phase d'expérimentation animale est nécessaire et ne peut pas être substituée par des tests sur des cellules *in vitro*.

7609 En cancérologie, les patientes atteintes d'un cancer du sein avancé vont développer dans 70% des cas, des métastases à l'os. Or, très peu de choses sont connues à ce jour sur leurs mécanismes. Ces métastases sont généralement caractérisées par une destruction massive de l'os responsables de fortes douleurs, de fractures, et de compressions nerveuses pouvant entraîner des paralysies. Elles sont dans leur majorité incurables et seuls des soins à visée palliatifs sont aujourd'hui apportés.

L'objectif de ce projet est de tester l'impact d'une molécule afin d'évaluer sa valeur thérapeutique dans la limitation de la progression des métastases osseuses et ceci requière l'utilisation d'animaux.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R : Pour la réduction du nombre d'animaux, une étude pilote pour tester l'impact et la tolérance de cette molécule sera effectuée. Par la suite, les statistiques ont été employées pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Ceci nous a conduits à un calcul final de 380 souris sur 4 ans.

Concernant le raffinement, pour réduire la douleur, toutes les précautions seront prises pour que l'animal ne souffre pas -par l'utilisation d'anti-douleurs (au cours des injections et dès que les animaux présentent des signes de douleur légère ou modérée) en aucun cas les animaux seront maintenus en vie en cas de douleur sévère. -par un environnement propre, stérile, l'eau ainsi que la nourriture est ad libitum, dans des cages avec couvercles filtrants qui seront continuellement mise en pièce en surpression afin d'éviter toutes infections – par un environnement enrichi des cages pour le bien-être des animaux -par l'utilisation systématique d'anesthésies (quelles que soient les procédures et avant la mise à mort) – par des temps d'acclimatation nécessaire pour diminuer au maximum le stress des animaux pouvant être engendré lors d'un changement de location (animalerie, pièce d'analyse) –par le maintien de la température des animaux. Le niveau de propreté requis pour les procédures sera respecté. Les injections et les suivis de protocoles seront réalisés en pièce de niveau de confinement de niveau L2 sous la responsabilité du porteur de projet compétent. Tous signes de stress seront pris en compte. Un suivi journalier sera aussi effectué par le personnel animalier. Le change sera réalisé deux fois par semaine. Concernant des études de remplacement, les effets de cette molécule pouvant être locaux (tumeurs) mais aussi impacter des organes à distance (foie), cette phase d'expérimentation animale est nécessaire et ne peut pas être substituée par des tests sur des cellules *in vitro*.

7610 Les angiomes caverneux ou CCM sont des malformations vasculaires localisées principalement dans le cerveau des patients. Cette pathologie touche de 0.1-0.5% de la population. Dans 20% des cas, la maladie est héréditaire, causée par la mutation d'un des 3 gènes identifiés, « CCM1/2/3 ». Les lésions CCM sont assez semblables, quel que soit le gène CCM affecté. La maladie est très évolutive, puisque le nombre et la taille des lésions augmentent au cours de la vie. Les angiomes caverneux peuvent entraîner des crises d'épilepsie et/ou des déficits neurologiques dus à des hémorragies cérébrales répétées. L'unique traitement possible est l'ablation de l'angiome (neurochirurgie), qui se révèle impossible si la malformation est trop profonde (risque vital). L'absence de traitement est donc un problème majeur pour les patients non opérables. Il est urgent de définir des approches thérapeutiques curatives pour empêcher le grossissement des lésions existantes, voire entraîner leur régression et diminuer le risque hémorragique.

La souris possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'homme et les outils nécessaires pour induire une mutation dans l'un des gènes CCM sont disponibles. Nous avons développé plusieurs modèles CCM chez la souris, qui reproduisent fidèlement les malformations CCM du cerveau des patients. Il n'existe pas d'équivalent aujourd'hui pour pouvoir réaliser des tests précliniques. Nous avons précédemment défini un modèle souris CCM très pertinent pour la réalisation d'essais thérapeutiques curatifs.

Dans ce modèle « modéré », les malformations vasculaires cérébrales se développent lentement et progressivement de façon similaire à ce qui est retrouvé chez les patients. Il nous permet également d'avoir la puissance statistique nécessaire pour déceler l'effet bénéfique d'un composé thérapeutique curatif potentiel sur des lésions préexistantes. Cependant, dans ce modèle modéré, 32% des animaux CCM décèdent avant l'âge adulte de causes secondaires indépendantes de la maladie. Nous avons acquis par collaboration une nouvelle souris qui devrait nous permettre d'éviter ces pathologies secondaires (et diminuer le nombre d'animaux utilisés), tout en reproduisant la maladie.

Notre objectif principal est d'évaluer l'effet curatif potentiel d'agents pharmacologiques au cours d'essais thérapeutiques précliniques dans notre modèle modéré de la maladie CCM. Nous commencerons par tester le composé C1 qui a montré un effet bénéfique préventif dans un modèle CCM rapide et sévère chez la souris (baisse significative du développement des lésions). Il est maintenant important de connaître son effet curatif potentiel à long terme dans notre modèle modéré, plus proche de la situation trouvée chez les patients.

Le 2nd objectif est de réaliser des tests limités (32 souris maximum) pour vérifier si la souris récemment acquise permet 1/ une charge lésionnelle cérébrale équivalente à celle du modèle actuel et 2/ une meilleure survie des animaux CCM. Dans l'affirmative, il sera aussitôt substitué au modèle actuel pour les essais thérapeutiques, ce qui nous permettra de réduire le nombre d'animaux CCM du projet.

Toutes les procédures expérimentales sont mises en œuvres par des personnes expérimentées et sont utilisées depuis de nombreuses années au laboratoire.

La procédure n°1 consiste en une injection unique d'un composé permettant d'inactiver l'un des gènes CCM et de déclencher le développement de la maladie chez la souris. Cette procédure concernera la totalité des animaux du projet (total de 304-312 souris maximum).

La procédure n°2 (implantation sous cutanée d'un dispositif diffusant le composé thérapeutique) a pour but l'administration d'un traitement de façon diffus, pendant 21 ou 28 jours consécutifs. Ainsi, il sera possible d'évaluer l'efficacité d'un agent thérapeutique candidat sur la réduction de la taille des lésions préexistantes. Tous les animaux concernés par l'essai thérapeutique sont analysés à un stade où le taux de mortalité observé lors de nos précédentes études est le plus faible. Ce stade (4mois) est parfaitement caractérisé, ce qui nous permet de minimiser le nombre d'animaux nécessaire à nos analyses.

La procédure n°3 (prélèvement sanguin sur animal anesthésié) nous permettra de réaliser des dosages de marqueurs dans le sérum (marqueurs d'inflammation, de coagulation) au cours du développement de la maladie. Deux prélèvements maximum seront réalisés sur un même individu, en respectant les recommandations d'un volume maximum de 20% du poids de l'animal.

La procédure n°4 (perfusion sur animal anesthésié) permettra d'enlever le sang résiduel contenu dans les lésions et de faciliter ainsi la quantification des lésions par imagerie microscopique.

Nos modèles CCM souris reproduisent les lésions vasculaires cérébrales trouvées chez les patients. Actuellement, seuls les modèles animaux permettent d'obtenir toute la complexité neuro-vasculaire de la maladie et sont nécessaires pour la réalisation de tests précliniques. Tous nos résultats seront soumis à une analyse statistique prédéfinie.

Les animaux sont maintenus dans les conditions standards d'hébergement et seront surveillés par une personne responsable du bien-être. Dès leur 8e jour de vie, ils feront l'objet d'un examen hebdomadaire scoré, basé sur les points limites établis au préalable (aspect général : qualité du pelage / absence de larmolements / gonflement de l'abdomen ; comportement de l'animal : déplacement / prostration / agressivité), permettant de déceler au plus tôt un éventuel état de souffrance et la mise en place d'un traitement anti-douleur. Un suivi du poids hebdomadaire sera notre principal critère pour détecter la souffrance. Dès 5% de perte de poids, l'animal sera repesé 3 jours plus tard. En cas de nouvelle perte de poids (>10%) ou à l'association d'autres signes de souffrance (prostration, tremblements...) ou à l'apparition d'un gonflement anormal de l'abdomen nous procéderons à la mise à mort de l'animal et à son analyse.

Notre projet s'inscrit dans le cadre d'un réseau européen. Nos projets sont soutenus par l'Association de patients. Nous leur présentons régulièrement l'avancée de nos recherches qui devraient aboutir à l'élaboration de stratégies thérapeutiques applicables à l'homme, notamment pour les patients non opérables.

7611 L'obésité est en augmentation croissante dans les pays industrialisés et les pays en voie de développement et contribue à l'augmentation des pathologies cardiovasculaires qui se situent au premier rang des causes de mortalité dans le monde. De ce fait, l'étude des mécanismes impliqués dans le développement de cette pathologie constitue un enjeu majeur de santé publique.

Notre projet a pour but de mieux comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu dans l'obésité, et plus particulièrement d'étudier l'effet de la modulation de la réponse inflammatoire sur le développement de cette pathologie. Seule l'expérimentation *in vivo*, qui mime de façon fidèle la complexité de la réponse inflammatoire dans un contexte d'obésité nous permettra de mettre en lumière des acteurs clés impliqués dans la pathogenèse de cette maladie.

Pour cela, nous évaluerons différents paramètres métaboliques et immunologiques chez des souris soumises à un régime riche en acides gras, suite à la modulation de certains acteurs de la réponse inflammatoire chronique.

Nous utiliserons un modèle de souris chimères afin d'étudier spécifiquement le rôle de deux molécules dans les cellules inflammatoires d'origine médullaire dans notre contexte d'étude. Pour cela, des souris seront irradiées et reconstituées avec de la moelle osseuse de souris déficientes pour nos molécules d'intérêt. L'irradiation est indolore, et l'injection de cellules médullaires sera réalisée sous anesthésie gazeuse. Nous étudierons également l'effet de la délétion génétique de deux molécules dans le développement de l'obésité chez des souris transgéniques. L'ensemble des souris de ces deux modèles sera soumis à un régime gras pendant 20 semaines et à des tests de tolérance à l'insuline et au glucose avant d'être mis à mort. Ces tests consistent en l'administration d'insuline par voie intrapéritonéale ou de glucose par voie orale, des prélèvements de sang seront ensuite réalisés sur souris vigile à différents temps pour doser le taux de glycémie.

Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera au total 420 souris.

Les différentes procédures expérimentales ont été pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les paramètres expérimentaux ont été établis lors de projets antérieurs, et permettent de minimiser le nombre d'animaux utilisés. Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris, par une surveillance quotidienne rigoureuse des animaux. Nous avons défini dans la grille ci-jointe, en accord avec le vétérinaire, les paramètres physiques et comportementaux à surveiller, et les attitudes à adopter en fonction de chaque situation, et ainsi décidé de points limites. Un niveau de douleur trop élevé entraînerait l'exclusion du protocole et la mise à mort anticipée de l'animal. Les conditions d'hébergements (température, hygrométrie, cycle jour/nuit) seront contrôlées, ainsi que le nombre d'animaux par cage, et un enrichissement par ajout de carrés de coton sera prévu.

Les résultats de ce projet nous permettront de comprendre, *in vivo*, le rôle de l'inflammation mise en jeu dans les différents types cellulaires et tissulaires et son implication dans l'obésité.

7612 La grippe est une infection virale aiguë qui se propage facilement d'une personne à une autre et qui peut toucher n'importe qui dans n'importe quel groupe d'âge. D'après l'OMS, la grippe est un problème de santé publique sérieux qui provoque des maladies graves et des décès dans les populations à plus haut risque. Au niveau mondial, elle est responsable de 250 000 à 500 000 décès par an.

Le moyen le plus efficace de se prémunir de la maladie ou d'une issue grave est la vaccination. Des vaccins sûrs et efficaces existent et sont utilisés depuis plus de 60 ans. Cependant, les virus grippaux peuvent développer une résistance à ces médicaments. La recherche de vaccins ou molécules ayant une efficacité supérieure à celle des vaccins actuellement sur le marché reste donc indispensable.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser des modèles infectieux chez la souris et le furet après infection du virus de la grippe dans le but d'évaluer l'efficacité de produits antiviraux.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale pourra être utilisée afin de suivre l'infection *in-vivo* et/ou la biodistribution de produits antiviraux. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas d'euthanasie d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps, diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et sont donc éthiques.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre de groupe sera variable, pour chaque étude, en fonction du nombre de conditions expérimentales à tester. Un nombre maximal de 1000 souris et de 300 furets, dans l'ensemble du projet, pourra être utilisé.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité et/ou la biodistribution de produits antiviraux dans un organisme entier vivant. Les espèces souris et furet ont été choisies car elles constituent des modèles classiquement utilisés dans les études sur la grippe.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de traitement ou mise à mort des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antivirales.

7613 La description et la compréhension des facteurs qui affectent la circulation d'agents infectieux dans les populations animales sauvages sont importantes d'un point de vue fondamental, mais aussi appliqué. Les populations d'oiseaux marins sauvages vivant dans les zones polaires de l'hémisphère sud (notamment les albatros et manchots) sont de plus en plus sujettes à des menaces dues à des maladies infectieuses, en plus d'autres menaces environnementales, et il est primordial de disposer de données de base sur l'état éco-épidémiologique de ces systèmes et de comprendre leurs dynamiques et l'efficacité éventuelle de moyens d'intervention sur des espèces menacées. Les populations de vertébrés se reproduisant en colonies sont particulièrement importantes à étudier dans ce contexte car, de par leur regroupement en unités de forte densité, elles peuvent subir des épisodes de mortalités pouvant atteindre des centaines voire des milliers d'individus, et différents processus complexes peuvent affecter la transmission d'agents infectieux entre ces unités de distribution discrète. Le projet repose sur la réalisation de suivis éco-épidémiologiques par la collecte d'échantillons sanguins et d'écouvillons cloacaux et oro-pharyngés dans des colonies d'oiseaux marins des îles subantarctiques et par leur suivi individuel par marquage à l'aide de bagues aux pattes ou la pose de loggers GPS miniaturisés. Les agents infectieux concernés sont en particulier : les virus de l'Influenza Aviaire, la bactérie responsable du choléra aviaire *Pasteurella multocida*, le virus de la maladie de Newcastle, la bactérie responsable de la maladie de Lyme *Borrelia burgdorferi* sensu lato, des flavivirus et *Toxoplasma gondii*. Les espèces et effectifs concernées pour la durée du projet sont : Manchot royal (*Aptenodytes patagonicus* ; n = 120), Gorfou sauteur (*Eudyptes moseleyi* ; n = 120), Gorfou macaroni (*Eudyptes chrysolophus* ; n = 120), Manchot papou (*Pygoscelis papua* ; n = 30), Albatros à bec jaune (*Thalassarche carteri* ; n = 60), Albatros à sourcil noir (*Thalassarche melanophris* ; n = 90), Albatros hurleur (*Diomedea exulans* ; n = 30), Albatros fuligineux à dos sombre (*Phoebastria fusca* ; n = 30), Albatros fuligineux à dos clair (*Phoebastria palpebrata* ; n = 30), Pétrel à menton blanc (*Procellaria aequinoctialis* ; n = 60), Pétrel bleu (*Halobaena caerulea* ; n = 30), Pétrel géant (*Macronectes giganteus* ; n = 60), Labbe subantarctique (*Catharacta antarcticus* ; n = 60), Chionis bec en fourreau (*Chionis minor* ; n = 60). Nombre total : 900.

L'étude porte spécifiquement sur la circulation d'agents infectieux dans des populations naturelles d'oiseaux sauvages donc les espèces des populations concernées ne peuvent être remplacées. Les tailles d'échantillons ont été déterminées en considérant les critères de réduction et de raffinement pour permettre des comparaisons pertinentes des taux d'exposition aux agents infectieux entre groupes d'individus échantillonnés, ainsi que des mouvements de certaines catégories d'individus. Les protocoles expérimentaux ont été élaborés afin de minimiser la douleur et l'inconfort en faisant intervenir un personnel expérimenté pour les manipulations et en effectuant les prélèvements rapidement (moins de 5 min) et sans anesthésie. Les oiseaux sont relâchés rapidement sur le site de leur capture.

7614 La schizophrénie est une pathologie caractérisée par différentes classes de symptômes, qui comprennent des déficits cognitifs comme des troubles de l'attention et de la mémoire. Ces déficits, fortement handicapants pour les patients, ne sont pas atténués par les traitements actuels. Il est donc urgent de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Ces dernières années, il est apparu clairement que la schizophrénie est une maladie d'origine neuro-développementale. Les symptômes cognitifs découleraient d'anomalies dans les processus de mise

en place des circuits neuronaux, incluant la migration neuronale, la pousse neuritique et la différenciation neuronale. Nous avons récemment démontré que le récepteur 5-HT6 de la sérotonine joue un rôle crucial dans le contrôle de la migration et du positionnement des neurones, ainsi que dans la différenciation neuronale. Nos données préliminaires suggèrent que le récepteur 5-HT6 participe également à la régulation de la maturation des épines dendritiques. Egalement, il a été montré que les antagonistes du récepteur 5-HT6 suppriment en partie les déficits cognitifs dans divers modèles murins de schizophrénie. Ces données et nos résultats démontrant que le récepteur 5-HT6 participe à la mise en place des réseaux neuronaux suggère que ce récepteur pourrait être une cible thérapeutique nouvelle pour le traitement de ces déficits associés aux maladies neuro-développementales. Néanmoins, pour cela, il est nécessaire de comprendre les mécanismes sous-tendant l'action du récepteur 5-HT6. Nous proposons donc de caractériser l'influence du récepteur 5-HT6 et de ses substrats sur la mise en place des réseaux neuronaux afin de proposer de nouvelles stratégies visant à corriger les perturbations observées chez les patients présentant des déficits cognitifs liés à la schizophrénie ou à les prévenir chez les sujets à risque.

Ce projet prévoit l'utilisation de 96 souris sauvages et de 104 souris transgéniques KI-5HT6-GFP. Nous tacherons d'appliquer au mieux la règle des 3R

Remplacer : Une étude approfondie de la bibliographie disponible sur la période des 15 dernières années a été réalisée et a montré qu'il n'existe aucune approche susceptible de remplacer nos modèles d'étude. En effet, les méthodes *in vitro*, basées sur des cultures cellulaires ne permettent pas de maintenir l'intégrité des réseaux neuronaux et donc d'étudier leur architecture dans un contexte tissulaire authentique.

Réduire : le nombre d'animaux utilisé sera réduit au maximum tout en gardant une cohorte suffisante pour assurer la puissance statistique des résultats obtenus. Les animaux seront utilisés de manière optimale, en particulier, plusieurs approches seront utilisées sur le même animal : les analyses comportementales seront suivies de la fixation des tissus pour permettre les analyses immunohistochimiques et biochimiques.

Raffiner : Afin de limiter le stress et la souffrance des animaux, les portées seront maintenues avec leur mère jusqu'au sevrage. Puis les mâles et les femelles seront séparés et hébergés dans des cages avec couvercle filtrant et contenant du coton. Les cages seront changées une à deux fois par semaine.

7615 Le sternum est l'os situé devant le thorax, entre les côtes. Pour accéder au cœur lors d'une opération cardiaque, le chirurgien cardiaque coupe le sternum en deux parties égales dans le sens de la longueur. La fermeture du sternum à la fin d'une chirurgie cardiaque se fait au moyen de fils métalliques qui encerclent le sternum. Cette technique ne permet pas d'obtenir une bonne fixation du sternum et engendre de nombreuses complications et doit être améliorée.

Le projet a pour objectif de développer une nouvelle technique chirurgicale au moyen d'un ciment orthopédique que l'on place à l'intérieur de l'os en complément des fils métalliques afin de rendre la fermeture sternale plus stable et optimale. La diminution des complications sternales permettra d'assurer des suites opératoires plus simples, et de réaliser une réduction des coûts de santé.

La corticale du sternum est fine (1 mm d'épaisseur). Les ciments orthopédiques traditionnels provoquent à leur contact une nécrose osseuse de 1 à 5 mm d'épaisseur qui détruit l'os. Ces ciments ne peuvent donc pas être utilisés au niveau du sternum car il le nécroserait sur toute son épaisseur. La nécrose par les ciments orthopédiques classiques est causée par la chaleur (70-90°C) qu'ils dégagent lors de leur polymérisation. L'objectif du projet est de mettre en œuvre un nouveau ciment orthopédique qui ne nécrose pas ou seulement faiblement l'os à son contact afin de pouvoir l'utiliser au niveau du sternum. L'épaisseur de la nécrose engendrée par le ciment à son contact ne devra pas être supérieure à 0.5 mm. Six types de formulations de ciment avec des températures de polymérisation allant de 40 à 90°C et différents temps de polymérisation sont créées. Un test sur modèle animal est mis en œuvre afin de sélectionner le ciment qui engendre le moins de nécrose osseuse. Le modèle animal choisi est le lapin qui est l'animal le plus utilisé dans ce type d'expérimentation. 27 animaux seront nécessaires. 3 animaux pour chaque type de ciment sont nécessaires pour obtenir un minimum de signification statistique. Le ciment est mis en place dans deux sites (condyle fémoral et médullaire du tibia). Les ciments orthopédiques traditionnels en polymère de polyméthylméthacrylates (PMMA) provoquent à leur contact une destruction osseuse de

1 à 5 mm d'épaisseur. L'objectif du projet est de mettre en œuvre un nouveau ciment orthopédique de type PMMA qui ne détruit pas ou seulement faiblement l'os à son contact.

Un seul site d'implantation (un membre inférieur) est choisi pour limiter la douleur post opératoire de l'animal. Les lapins seront anesthésiés profondément par un mélange de kétamine/xylazine, ils seront placés sous lampes chauffantes jusqu'à leur réveil et recevront une injection de buprénorphine pour limiter la douleur.

Les lapins seront hébergés individuellement pour ne pas risquer qu'ils s'abiment entre eux.

7616 Les amyloses sont des maladies caractérisées par l'agrégation de protéines mal repliées en structures filamenteuses très stables appelées fibres amyloïdes. Ces fibres peuvent induire une toxicité cellulaire soit directement et/ou en empêchant les échanges moléculaires par leur accumulation intracellulaire et extracellulaire. Les amyloses interviennent dans de nombreuses maladies (maladie d'Alzheimer, cardiomyopathie, diabète de type II...) touchant différents organes (cerveau, cœur, pancréas...). De par leur diversité et par l'absence de symptômes spécifiques, leur diagnostic est généralement difficile et requiert plusieurs examens invasifs, car chaque pathologie est associée à une protéine spécifique, comme par exemple la protéine amyloïde beta dans la maladie d'Alzheimer, l'amyline dans le diabète de type 2 ou la transthyrétine dans les cardiopathies et neuropathies associées.

Le but de ce projet est d'élaborer un outil d'imagerie médicale capable de cibler des biomarqueurs expérimentaux de l'évolution de la pathologie afin d'établir un diagnostic discriminant et précoce, dans l'objectif de mettre en œuvre les traitements les plus spécifiques possible. Ceci sera étudié sur des animaux entre 1 mois et 18 mois pour définir les biomarqueurs les plus appropriés. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Cette étude sera réalisée par immunohistochimie, le nombre d'animaux a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. Un total de 400 rongeurs sur 5 ans est requis.

Des méthodes d'anesthésie sont pratiquées avant chaque prélèvement afin d'éviter les souffrances. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe permettent de garantir leur bien-être. Dans le cas où des effets indésirables interviendraient, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

Cette étude permettra de développer des outils d'imagerie pour un diagnostic plus précoce de la maladie d'Alzheimer.

7617 Contexte Scientifique et médical :

La toux est un symptôme prédominant dans la maladie asthmatique et pourtant, l'ensemble des mécanismes impliqués dans la toux, en particulier à l'effort, reste incertains et l'un des sujets phare de la recherche médicale. Des travaux récents réalisés par notre équipe mettent en évidence une diminution du réflexe de toux durant l'effort afin de privilégier l'adaptation des besoins de l'organisme imposés par l'effort. Cependant, chez le modèle animal de la maladie asthmatique que nous avons développé (i.e. sensibilisé à l'ovalbumine), il a été montré l'absence de diminution du réflexe de toux à l'effort. La poursuite des travaux sur cette thématique de l'influence de l'effort sur la toux sur un modèle animal de maladie asthmatique vise ainsi une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la toux à l'effort chez le patient asthmatique et permettra dans les suites une meilleure prise en charge médicale de ces patients.

Description des objectifs du projet :

Ce projet s'inscrit donc dans la suite logique de nos précédents travaux, L'objectif est d'étudier l'influence d'un traitement par corticoïdes (i.e. traitement reconnu de l'asthme chez l'homme) sur la modulation du réflexe de toux à l'exercice chez le lapin asthmatique. L'objectif secondaire est de comparer différentes modalités d'administration (aérosols, intraveineux) d'un traitement par corticoïdes sur la modulation du réflexe de toux. L'étude sera conduite sur 32 lapins adultes de type "néo-zélandais" sensibilisés à l'ovalbumine (modèle animal de la maladie asthmatique). La sensibilisation à l'ovalbumine sera obtenue par injection intra-péritonéale d'ovalbumine suivi d'une

exposition à des aérosols d'ovalbumine, comme décrit dans la littérature. Les lapins seront ensuite répartis en quatre groupes : 1 groupe témoin, 1 groupe avec injection intraveineuse de corticoïdes, 1 groupe avec inhalation d'aérosols de corticoïdes et 1 groupe avec inhalation d'aérosols de sérum physiologique. Nous prouverons leur maladie asthmatique par des tests cutanés (une injection sous-cutanée) et bronchiques (lavage broncho-alvéolaire avec analyse microscopique des cellules bronchiques réalisé après la mise à mort de l'animal). L'anesthésie générale sera réalisée par voie intraveineuse et la profondeur de celle-ci sera vérifiée toutes les trente minutes par un protocole adéquat. Après anesthésie générale, la stimulation de la trachée se fera par un cathéter introduit chirurgicalement, provoquant une stimulation mécanique de très courte durée (50 millisecondes). Sur les membres postérieurs des lapins anesthésiés, des électrodes de surface seront placées sur la peau pour effectuer la stimulation électrique musculaire, maintenue pendant 3 minutes. Nous étudierons alors la présence d'un réflexe de toux par stimulation trachéale, sous anesthésie générale, au repos et à l'effort dans les différents groupes.

Dans le cas où notre hypothèse de travail serait vérifiée (i.e. restauration, par un traitement corticoïde, de la désensibilisation du réflexe de toux à l'exercice), nos résultats apporteront des données importantes quant au rôle d'un traitement anti-inflammatoire vis à vis de la toux à l'effort. Cela laisserait à supposer qu'à l'effort, l'administration de corticoïdes est susceptible de modifier les réflexes de défense respiratoire. Ces résultats permettront une meilleure compréhension du fonctionnement de la maladie asthmatique chez le lapin, et donc chez l'homme, ouvrant la porte à des traitements plus adaptés, permettant une amélioration de la qualité de vie de nos patients. Dans le cas où notre hypothèse ne serait pas vérifiée, cela remettrait en question le rôle des corticoïdes dans la modulation du réflexe de toux à l'effort, et permettrait donc de nous orienter vers une hypothèse différente.

Dans la mesure de la conformité avec les exigences des 3 R, il n'existe pas d'étude antérieure, faite dans un autre pays, destinée à répondre aux questions scientifiques posées dans ce projet.

Remplacer : L'étude de ce réflexe nécessite l'utilisation d'un modèle physiologique intégré qui ne peut être remplacé par des méthodes alternatives. En effet, notre protocole expérimental nous autorise à stimuler mécaniquement la trachée de l'animal, et ce très finement dans le cycle respiratoire ce qui n'est pas envisageable chez l'homme. De plus, le modèle lapin adulte de type Néo-zélandais a été choisi car c'est un modèle animal qui présente un réflexe de toux contrairement au modèle rongeur souris ou rat.

Réduire : L'expérience de notre équipe dans cette thématique et sur ce modèle animal nous permet d'envisager un nombre minimum d'animaux afin de faire ressortir une significativité des résultats. Ainsi, un nombre maximum de 8 lapins dans chaque groupe soit au total 32 lapins sera suffisant.

Raffiner : En amont de l'expérimentation, les animaux sont hébergés dans l'animalerie de l'Université où toutes les procédures en matière de confort et de minimisation du stress sont appliquées. L'acclimatation des animaux pendant une semaine après réception, la surveillance quotidienne des lapins pendant la période de sensibilisation ainsi que la surveillance de la profondeur de l'anesthésie et de l'analgésie toutes les 30 minutes pendant l'expérimentation chez l'animal anesthésié servira à la diminution du stress de l'animal et la réduction de la souffrance et de douleur lors d'expérimentation animale.

7618 La production de volailles est une production d'animaux à croissance rapide ce qui implique des exigences nutritionnelles notamment d'un point de vue de l'apport protéique. Afin de s'affranchir de la dépendance protéique de la France vis à vis des pays producteurs de soja, il est nécessaire de mieux valoriser les sources de protéines locales (France/Europe) dans l'alimentation des volailles. Des travaux existent pour améliorer la teneur en protéines de certaines matières premières connues (tourteaux de colza, tournesol.) par des processus technologiques mais aussi pour identifier des matières premières potentiellement intéressantes mais encore mal connues / caractérisées pour leur utilisation dans l'alimentation des volailles. L'utilisation de ces matières premières "innovantes" dans l'alimentation des volailles nécessite de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la digestion des nutriments, d'identifier des freins et les leviers d'action potentiels à leur utilisation dans l'alimentation. Les protéines et les minéraux sont importants du fait de leur rôle primordial pour la croissance musculaire/osseuse mais aussi au regard des rejets dans l'environnement. Il est donc nécessaire d'améliorer la compréhension de la digestion de ces nutriments, notamment dans le cas

de matrices alimentaires complexes (matières premières variées) contenant des matières premières innovantes. L'objectif de cette étude est donc de tester l'effet de différentes matières premières protéiques sur la digestion chez le poulet de chair en croissance. Pour cela, des poulets mâles de type Ross PM3 (souche commerciale classiquement utilisée en élevage) seront élevés de 1 à 28-29 jours d'âge. Un total de 200 animaux sera nécessaire.

Réduire : Ce dispositif permet d'avoir 12 animaux par traitement alimentaire. C'est le minimum requis pour pouvoir collecter suffisamment de contenu digestif pour toutes les analyses ultérieures.

Remplacer : Ce type d'analyse nécessite l'utilisation d'animaux puisqu'à l'heure actuelle, aucun modèle de digestion *in vitro* ou *in silico* n'est capable de représenter la complexité des mécanismes de digestion, notamment en volaille. Les données acquises sont ensuite utilisées dans des projets de modélisation *in silico* menés au sein de l'équipe.

Raffiner : Les animaux seront élevés au sol avant une phase en cages individuelles, indispensable pour pouvoir enregistrer leurs consommations d'eau et d'aliment. Les cages individuelles sont équipées de grilles permettant un contact visuel et olfactif avec les congénères, le sol des cages est adapté à la taille et au poids des animaux et les cages sont équipées de jouets suspendus à picorer. Les animaux ne mangent pas ou peu pendant la période nocturne, les pesées hebdomadaires se feront le matin. Cela permet d'avoir des pesées homogènes (sans l'effet de la consommation) tout en évitant des mises à jeun répétées.

7619 L'amyotrophie spinale (SMA) est la maladie génétique la plus fréquente chez les enfants et à ce jour aucun traitement n'existe. Cette maladie est caractérisée par la mort des motoneurones et une atrophie des muscles qui conduisent progressivement à une paralysie et à un décès prématuré (avant l'âge de 2ans) pour la forme la plus sévère. Dans la plupart des cas, la SMA est due à une mutation du gène SMN1 (Survival Motor Neuron 1). Notre équipe développe des stratégies de thérapie génique pour les maladies neuromusculaires comme la SMA, qui consistent à utiliser des vecteurs viraux sc-AAV9 (Adeno-Associated Virus de sérotype 9) pour ramener un gène fonctionnel (« gène médicament ») aux cellules. Ainsi, nous avons démontré que l'injection par voie intraveineuse de ce vecteur permet de transférer efficacement un gène médicament dans un grand nombre de tissus, y compris les motoneurones. Grâce à cette découverte, nos travaux ainsi que ceux d'autres équipes, ont démontré qu'une seule injection intraveineuse du vecteur scAAV9 portant le gène SMN1 fonctionnel permet une forte amélioration de la survie d'un modèle murin de SMA. Ces travaux sont à l'origine du premier essai clinique de traitement de la SMA par thérapie génique récemment initié.

Cependant, bien que particulièrement prometteuse, cette stratégie peut encore être améliorée notamment en terme de survie des malades. Ces améliorations passent, entre autre, par une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et plus particulièrement du rôle que jouent les tissus périphériques dans le développement de la maladie. Ainsi, dans le but d'améliorer nos stratégies de thérapie génique, nous voulons initier une étude approfondie du rôle du muscle squelettique et des cellules souches du muscle dans le développement de la SMA. Pour répondre à cette problématique, nous voulons générer un nouveau modèle de souris mutées pour le gène *Smn* uniquement dans les cellules souches musculaires. Cette mutation pourra être uniquement activée par l'injection en intrapéritonéale d'une molécule communément utilisée pour ce type de modèle : le tamoxifène. Ce modèle nous permettra d'étudier le rôle du gène *Smn* dans les fonctions des cellules souches musculaires lors de la myogenèse post natal (102 souris) et au cours de la régénération musculaire (180 souris). Enfin, la mutation du gène responsable de la SMA dans les cellules souches musculaires permettra également d'étudier leur rôle potentiel dans la physiopathologie de la maladie (240 souris).

Du fait des nombreuses interactions entre la cellule souche et son environnement (fibres musculaires, nerfs, tissus conjonctif) une étude basée uniquement sur un modèle *in silico* ou *in vitro* ne permettrait pas répondre de manière complète à la problématique. Le plan expérimental a été créé pour réduire, au strict nécessaire, le nombre de souris impliquées tout en garantissant une conclusion scientifique fiable à l'aide de tests statistiques appropriés. Dès que possible, les animaux pourront également être utilisés comme leur propre contrôle. Enfin, le stress et l'isolement des souris seront évités en garantissant les meilleures conditions d'hébergements (enrichissement, salles d'expérimentation appropriées) et avec la possibilité d'étudier ensemble plusieurs sujets de la même portée. Les

procédures impliquées dans cette étude ont déjà fait l'objet de publications pour l'étude d'autres gènes dans les cellules souches musculaires et des protocoles d'analgésique ainsi que des points limites aux expériences sont clairement définis.

Cette étude, via le modèle que nous souhaitons créer, nous permettra de clairement établir le rôle des cellules souches musculaires dans développement de la SMA et ainsi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour nos futures stratégies de thérapie génique pour le traitement de la SMA.

7620 L'autophagie (AP) est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. L'exécution et la régulation de l'AP mettent en jeu des gènes spécifiques (atg) et différentes voies de signalisation. L'AP est un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des cancers.

La virothérapie oncolytique est une nouvelle approche dans la thérapie anticancéreuse. Elle implique l'utilisation des virus non-pathogènes capables d'infecter, de se répliquer et de détruire spécifiquement les cellules tumorales sans affecter les tissus sains. Récemment, des travaux ont montré que l'AP joue un rôle important dans l'oncolyse de certains virus oncolytiques et que sa modulation par des agents chimiques (ex : rapamycine) pouvait améliorer l'efficacité de la virothérapie oncolytique dans des modèles de tumeurs murines.

Nous avons montré que la restriction calorique et des composés capables de mimer le jeûne et la restriction calorique (CRMs, caloric restriction mimetics) induisent l'AP. Récemment, plusieurs équipes se sont intéressées à l'apport bénéfique de la restriction calorique au traitement des cancers et particulièrement à la chimiothérapie.

Le but de ce projet consiste à évaluer l'implication de l'AP, induite par le jeûne et les CRMs, dans l'efficacité de la virothérapie oncolytique et les mécanismes sous-jacents notamment immunodépendants. Nous souhaiterons effectuer cette étude en utilisant des souris immunocompétentes normales (n. 3856) ou transgéniques déficientes en autophagie (n. 240). Ce projet se dessine sur 5 ans et il est basé sur 4 procédures séquentielles. Le passage d'une procédure à l'autre ne se fera qu'après validation de l'hypothèse de travail et l'étude sera arrêtée si les expérimentations invalident l'hypothèse de travail. Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'existe pas d'autres modèles d'étude de l'efficacité de la virothérapie oncolytique (toxicité, effets immunodépendants). Nous avons choisi la souris comme modèle pour la facilité d'hébergement, d'élevage et l'accès au développement d'animaux transgéniques. Nous effectuerons des expériences d'infection et de croissance tumorale. Pour la réalisation de cette étude, nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire au maximum le nombre d'animaux pour les groupes contrôles. La stabulation des animaux sera conventionnelle et ils recevront un régime alimentaire normal. Un milieu enrichi adapté est prévu pour l'hébergement des souris pour minimiser l'angoisse (présence, dans les cages, des nids végétaux et/ou tunnels en cartons). Les animaux sont observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. Les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Si des souris apparaissent affaiblies, de la nourriture et du gel à haute valeur nutritive seront fournis dans la cage. 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.

7621 Ce projet est centré sur l'adressage sélectif d'agents d'imagerie et de chimiothérapie vers la tumeur pancréatique (ou adénocarcinome pancréatique, AP) afin d'améliorer le diagnostic et/ou la thérapie de ces tumeurs extrêmement agressives, quasi-incurables, représentant 80% des tumeurs du pancréas. Cet adressage sélectif se fait par l'intermédiaire du récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL), le LDLR, abondamment présent à la surface des cellules tumorales pancréatiques. Le LDLR, surreprésenté dans les AP peu et très agressifs de patients opérés, constitue une cible de choix pour la vectorisation tumorale. Ainsi, des vecteurs (peptides) reconnaissant spécifiquement sa partie extracellulaire, conjugués à des agents d'imagerie (fluorochrome, isotope) ou de chimiothérapie ont été développés et optimisés par nos collaborateurs possédant une expertise reconnue dans ce

domaine (4 brevets). L'objectif premier de cette étude est de démontrer l'intérêt d'utiliser ces outils en clinique afin d'améliorer le diagnostic de la tumeur pancréatique primaire et le suivi de la réponse thérapeutique, de déceler par imagerie médicale les métastases sans avoir recours à un acte chirurgical à visée exploratoire. Le second objectif consiste à utiliser ces peptides vectorisés conjugués à des agents chimiothérapeutiques pour augmenter l'efficacité des drogues couramment utilisées en clinique et de ce fait prolonger la survie des patients. Ces études seront réalisées sur différents modèles murins développant de façon spontanée ou induite des tumeurs primaires pancréatiques et des métastases hépatiques : 1/ des souris immunodéficientes (Nude) implantées en sous-cutanée avec des cellules tumorales pancréatiques murines pourvues ou dépourvues de LDLR, 2/ des souris génétiquement modifiées (PKI) et 3/ des souris immunodéficientes (Nude) greffées dans le pancréas avec des cellules tumorales pancréatiques humaines. Les expériences relatives à ces deux études nécessitent d'être réalisées à partir de modèles murins d'AP induits ou spontanés reproduisant au mieux les caractéristiques de l'AP humain. Le nombre d'animaux par groupe expérimental a été réduit au minimum requis pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Il a été défini avec un risque alpha de 0.05, une puissance du test de 0.8, une forte accumulation de l'agent d'imagerie dans l'AP par rapport aux organes sains ou une réduction significative du poids/volume tumoral chez les souris traitées avec la drogue vectorisée par rapport aux souris traitées avec la drogue non-vectorisée. Le nombre total de souris pour cette étude s'élève à 228. Un enrichissement matériel (tunnel/maison en carton, coton/papier) de l'environnement des animaux est mis en place dans toutes les cages afin qu'ils expriment un répertoire diversifié de comportements normaux. De plus, les actes chirurgicaux (implantation de cellules tumorales dans le pancréas ou en sous-cutané), l'observation quotidienne des animaux et l'établissement du score de douleur seront réalisés par des personnes compétentes (formations en expérimentation animale et en chirurgie) et toute perte de poids, signe de douleur ou souffrance notable (cardiaque, respiratoire) de l'animal éveillé après anesthésie ou au cours du développement tumoral constituera le point limite de l'expérience. Toutes ces actions sont mises en place afin de respecter la règle des 3Rs.

7622 Les maladies du foie constituent un problème majeur de santé publique. Cependant, même si les hépatites virales et la maladie hépatique alcoolique sont cruciales au niveau mondial, elles ne représentent pas la majorité des affections hépatiques.

En effet, les pathologies hépatiques associées à l'obésité (NAFLD) représentent la première cause de maladie du foie dans les pays occidentaux. Les NAFLD regroupent différents stades d'atteintes hépatiques allant de la stéatose bénigne (accumulation de gras dans le foie) à la stéatohépatite non alcoolique (NASH), la fibrose ou la cirrhose.

Cette maladie hépatique a été associée à des changements de composition du microbiote intestinal (ensemble des microorganismes du tube digestif) et un rôle causal de ce microbiote dans le développement de ces atteintes hépatiques a été démontré chez la souris.

Certaines espèces bactériennes ont été identifiées comme étant plus fréquemment associées à la stéatose bénigne et significativement moins abondantes dans les formes plus évoluées de la maladie (NASH). Ces espèces peuvent être identifiées par des techniques de séquençage haut débit grâce à leurs gènes et sont alors appelées MGS (MetaGenomic Species).

Le but de notre étude est d'identifier ces MGS dans des microbiotes de patients atteints de stéatose bénigne et de confirmer leur effet protecteur vis-à-vis de l'évolution vers les stades avancés de la maladie. Pour cela, des souris dépourvues de microbiote (axéniques) seront colonisées avec des microbiotes de patients identifiés comme étant enrichis ou au contraire appauvris en MGS d'intérêt, puis ces souris seront soumises à un régime riche en graisses et en fructose afin d'explorer l'effet des microbiotes installés sur l'apparition et l'évolution des atteintes hépatiques.

Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 144 souris sur 5 ans (6 groupes de MGS+ et 6 groupes de MGS-). Chaque groupe sera composé de 12 souris ce qui est un minimum pour obtenir des résultats

statistiquement satisfaisant. Les souris n'auront comme seul traitement qu'une alimentation spéciale riche en gras et une boisson riche en sucre. Elles seront pesées de façon hebdomadaire. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose sur l'ensemble des animaux de ce protocole (mesure de la glycémie et de l'insulinémie).

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalín (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 4 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

7623 Dans le contexte du changement climatique et de l'augmentation de la population humaine, l'efficacité des productions animales doit être améliorée, pour augmenter la couverture des besoins alimentaires de la population mondiale. Aujourd'hui, le porc est l'animal le plus consommé au monde et environ 50% de la production porcine mondiale est réalisée en zone tropicale ou subtropicale (FAOSTAT, 2014). La majorité des races porcines disponibles sur le marché sont sélectionnées en environnement optimal (thermoneutralité, absence de pathogènes, alimentation équilibrée en énergie, protéines, vitamines et minéraux). Jusqu'à présent, les critères de sélection ont majoritairement été orientés sur les performances de croissance et de reproduction. En zones tropicales et subtropicales, ou lors d'événements extrêmes en milieu tempéré, le stress thermique, entraîne une diminution voire un arrêt de la consommation d'aliment chez le porc. Cette diminution de consommation a des conséquences directes sur le bien-être des animaux et indirectement sur la durabilité des élevages porcins. En regard de ces contraintes, l'animal efficace est celui qui est capable de réorienter, ou de déplacer l'équilibre entre ses voies métaboliques, selon les contraintes du milieu d'élevage. La connaissance de ces mécanismes permettra sur le long terme de mieux appréhender la gestion du stress thermique dans les élevages porcins par une amélioration combinée des pratiques d'élevage (élevage de précision) et des choix génétiques de l'éleveur.

Le projet visera à identifier les mécanismes physiologiques et génétiques contrôlant l'allocation des ressources entre les différentes fonctions biologiques de l'animal (croissance, reproduction, adaptation) dans l'objectif d'améliorer la robustesse des porcs en croissance et des truies. 1488 animaux seront utilisés dans le projet. Au vu du modèle d'étude et de l'intérêt pour la filière, les animaux ne peuvent pas être remplacés par d'autres modèles. Par conséquent, pour chaque expérimentation de ce programme, le nombre d'animaux sera réduit au maximum lorsque les mesures nécessaires sont invasives. Toute intervention douloureuse, autre que celles communément mises en œuvre en élevage (contention, prise de sang) seront réalisées sous anesthésie. Les expérimentations seront réalisées dans une unité expérimentale où les installations prennent en compte l'enrichissement du milieu des animaux et où le personnel est formé à l'expérimentation animale, aux notions de santé des animaux et aux notions de points limites pour favoriser leur bien-être.

Au final, ce programme permettra d'améliorer le bien-être des porcs face au stress thermique, en milieu tropical, comme en région tempérée lors de crises climatiques.

7624 L'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (ICFEP) est un problème majeur de santé publique. Actuellement, aucune stratégie de traitement n'a pas encore été établie pour réduire la morbidité et la mortalité de cette pathologie. Le but de ce projet est de valider *in vivo*, chez le rat, l'effet d'une molécule, identifiées *in vitro*, qui améliore la fonction diastolique liée à des facteurs de risque ICFEP indépendants, à savoir l'âge et l'hypertension. La molécule identifiée est un inducteur d'autophagie (AP). L'AP est un processus physiologique qui régule l'homéostasie cellulaire. L'AP est conservée au cours de l'évolution et caractérisée par une importante accumulation de vacuoles autophagiques à double membrane (autophagosomes) dans le cytoplasme des cellules. Les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes conduisant à la digestion de leur contenu par les hydrolases lysosomales. L'AP est aussi un mécanisme d'adaptation cellulaire en condition de stress et son absence est souvent observée dans des maladies neurodégénératives et cancers. Cette étude ne peut être conduite qu'*in vivo* car il n'y a pas de modèles alternatifs pour l'étude de l'activation de l'autophagie systémique. Pour la réalisation de cette étude, nous effectuerons des expériences

d'induction de l'autophagie chez le rat par un traitement à court (24h) et long (12 semaines) terme. Ce projet, d'une durée maximale de 3 ans, impliquera l'utilisation de 480 rats. Ce nombre d'animaux est le nombre maximal que nous envisageons d'utiliser. L'étude sera arrêtée si les manipulations initiales seront négatives par rapport à l'hypothèse de travail. Nous chercherons à regrouper les expérimentations afin de réduire le nombre d'animaux contrôles. Néanmoins, nous pourrions avoir à utiliser moins de rats si la significativité apparaît avec moins de rats. Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures a été mis au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, des tunnels en cartons et bâtonnets à ronger).

7625 Le Glaucome est l'une des principales causes de déficit visuel lié à l'âge et au diabète. A l'horizon 2020, 80 millions de personnes en seront atteintes. Cette maladie se caractérise par la dégénérescence des fibres nerveuses qui composent le nerf optique et la mort des neurones rétiniens à l'origine de ces fibres. Nous nous proposons de tester de nouvelles biomolécules développées dans notre laboratoire pour leur capacité à protéger les neurones rétiniens de la mort, dans un modèle expérimental de Glaucome. Ces peptides ont déjà fait la preuve de leur efficacité *in vitro* : ils favorisent l'élongation des prolongements qui permettent les connections entre neurones, et stimulent la régénération de ces prolongements, après section. Nous devons à présent apporter la preuve de l'efficacité de ces neuropeptides dans un contexte lésionnel plus proche de la clinique.

Le modèle de Glaucome que nous utiliserons sera réalisé sur des souris sous anesthésie générale. Cette technique est non invasive.

Les biomolécules à tester seront délivrées au niveau de la rétine sous anesthésie générale. L'intégrité de l'œil et notamment de la lentille, ainsi que les vaisseaux sanguins et les faisceaux musculaires seront préservés.

Pour mener à bien nos objectifs, un maximum de 90 souris âgées de neuf semaines sera nécessaire. Cette estimation tient compte des exigences statistiques et des contrôles nécessaires à la validation de nos substances actives. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Les souris seront hébergées par groupe de 5 individus et leur environnement sera enrichi de matériaux de nidification. Un suivi quotidien puis bihebdomadaire sera mis en place pour s'assurer du bon état général des animaux.

7626 Le gène « nucleoredoxin-like 2 » (Nxn12) est bi-fonctionnel et code pour deux protéines distinctes, RdCVF2 et RdCVF2L. RdCVF2 est sécrété par les photorécepteurs à bâtonnet et a une action protectrice sur les photorécepteurs à cône. RdCVF2L (ou glutarédoxine) est une enzyme qui réduit les dommages causés par le stress oxydant. Le gène Nxn12 s'exprime dans la rétine et d'autres régions du système sensoriel comme les neurones olfactifs. La souris Nxn12^{-/-} âgée présente un déficit de discrimination des odeurs. Par ailleurs, une étude publiée montre que l'inactivation du facteur de transcription OTX2 entraîne une diminution de l'expression de Nxn12. Or le gène OTX2 est exprimé dans la rétine et le système nerveux central, qui sont aussi des lieux d'expression du gène Nxn12.

Le but de la présente étude est de démontrer qu'OTX2 contrôle l'expression du gène Nxn12 dans la rétine et le système nerveux central. Pour y parvenir, nous étudierons le phénotype d'un modèle murin pour lequel le gène Nxn12 sera inactivé uniquement dans les sites d'expression d'OTX2 [souris Otx2Cre/+Nxn12^{cd/cd}]. Les effets de l'inactivation du gène Nxn12 seront évalués à l'aide d'électrorétinogrammes, de tests d'acuité visuelle et d'images de la structure des couches cellulaires de la rétine. Des études histologiques complémentaires seront réalisées après euthanasie de l'animal. Les résultats obtenus seront comparés à ceux que nous avons déjà sur la souris Nxn12^{-/-}.

Au total 120 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles et les différents âges testés. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale (fixe ou gazeuse pour les différentes procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne pour les techniques d'imagerie

de la rétine et les électrorétinogrammes. Une signalétique particulière des animaux en expérimentation est utilisée. Une observation régulière des animaux est effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux. Le nombre d'animaux 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 ».

L'objectif du projet implique l'utilisation d'animaux car la question des performances visuelles ne peut être étudiée *in vitro*.

7627 Une personne saine est protégée contre les infections par des pathogènes opportunistes comme le microorganisme *Pseudomonas aeruginosa* qui provoque des infections aiguës ou chroniques, parfois graves et mortelles. En revanche, les personnes atteintes de mucoviscidose, ou qui présentent une fonction pulmonaire diminuée, y sont particulièrement sensibles. Pourquoi ?

Pour répondre à cette question, il est essentiel de bien comprendre l'interaction dynamique entre le microenvironnement hôte et ces pathogènes.

Plusieurs paramètres tissulaires et certains facteurs physico-chimiques peuvent individuellement ou collectivement favoriser une infection aiguë et chronique. Notre projet vise à comprendre l'origine de la défaillance de la barrière épithéliale pulmonaire et son rôle dans l'exacerbation de l'infection et de l'inflammation. Nous étudierons plus particulièrement le rôle de la protéine prion cellulaire (PrPC), et celle de la protéine CFTR. La protéine PrPC intervient dans le contrôle de l'étanchéité de la barrière épithéliale, tandis que la protéine CFTR est directement impliquée dans le développement de la mucoviscidose.

Nous travaillons sur des lignées cellulaires humaines *in vitro*. Ces cellules proviennent de bronches, soit de personnes saines, soit de personnes atteintes de mucoviscidose. Nous souhaitons compléter ce travail par une étude *in vivo* sur un modèle animal. En effet, le recours à un organisme entier vivant est indispensable pour observer et comprendre la progression d'une infection bactérienne dans son environnement physiologique. Cette étude nous permettra aussi de mettre en évidence le rôle de la protéine prion dans les processus d'infection associées à la mucoviscidose.

Les différentes lignées de souris que nous utiliserons seront infectées sous anesthésie générale par *Pseudomonas aeruginosa* par instillation nasale. Afin d'évaluer au niveau pulmonaire et systémique la réponse inflammatoire développée suite à ces infections, nous allons réaliser des prélèvements tissulaires et sanguins sur animal euthanasié.

Nous envisageons dans un deuxième temps de traiter ces modèles animaux avec des molécules de régénération du tissu épithélial (molécules accélérant la régénération dermique et épidermique), afin de tester leurs potentiels bloquants de l'infiltration bactérienne dans les bronches. Cette étude nous permettra de valider nos observations à l'échelle cellulaire et d'envisager le développement de nouvelles approches thérapeutiques.

Au total, nous prévoyons d'utiliser 192 animaux nés et élevés dans nos installations à des fins scientifiques. Ce nombre a été calculé au plus juste pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Les méthodes expérimentales, réalisées sous anesthésie et analgésie, ont été choisies pour éviter l'apparition de douleurs lors des interventions. L'état de santé des animaux est surveillé tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Les animaux sont hébergés en groupe dans un milieu enrichi.

7628 A la Réunion la prévalence du diabète est deux fois supérieure à celle de la métropole. En conséquence l'incidence de l'insuffisance rénale chronique et terminale est également deux fois plus élevée à la Réunion. Parallèlement, à la Réunion, le risque infectieux épidémique représente un réel problème de santé publique, l'épisode du virus Chikungunya en 2005 en étant un bel exemple. Avec l'émergence mondiale en 2015 du virus Zika (ZIKV), le risque épidémique dans le Sud-est de l'océan Indien devient à nouveau une question particulièrement sensible. ZIKV est un virus transmis à l'homme par les moustiques du genre *Aedes*, ceux-là même qui furent responsables de l'épidémie du Chikungunya de 2005. La phase aiguë résolue, une sanctuarisation du ZIKV peut être observée dans

divers organes, particulièrement ceux étant à l'abri de la réponse immunitaire comme les gonades ou le cristallin. ZIKV est également retrouvé dans les reins avec une production active de virions dans les urines. On sait par ailleurs qu'un environnement hyperglycémique pourrait aggraver la fréquence et/ou la gravité d'infections chez des personnes diabétiques, des expériences menées chez l'animal suggérant même qu'un terrain diabétique pourrait retarder la réponse immunitaire anti-infectieuse. Par ailleurs aucune étude, à notre connaissance, ne s'est intéressé aux conséquences de la présence du virus ZIKA sur la fonction et l'intégrité du tissu rénal.

La rencontre des pathologies diabétiques fréquentes à la Réunion et de l'infection par le virus Zika dans une zone à fort risque épidémique pourrait constituer un risque majeur de santé publique. En effet l'association maladie métabolique et maladie infectieuse est de plus en plus mis en avant dans les phénomènes de comorbidité en santé publique.

Une des premières étapes de ce projet est de répondre à la question suivante : est-ce que dans un environnement hyperglycémique (diabète) les reins sont plus sensibles/réceptifs à l'infection par le virus Zika ? Pour répondre à cette question nous infecterons *ex vivo* des coupes de reins et *in vitro* des primo-cultures de cellules glomérulaires rénales provenant de souris rendues diabétiques que nous comparerons à des reins de souris normales. Pour ce projet nous avons fixé un plafond de 96 souris (48 diabétiques et 48 contrôles). Nous serons particulièrement vigilants afin de développer nos protocoles dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux vivants est indispensable car la néphropathie diabétique est impossible à reproduire sur des modèles *in vitro* simplifiés. En effet nous avons besoin de toute la complexité vasculaire et inflammatoire d'un organisme vivant pour mimer la pathologie humaine. Les études sont systématiquement optimisées d'après la littérature et/ou les observations réalisées au laboratoire (doses injectées, durée du traitement). De plus le traitement sera administré de la façon la moins invasive possible (injection intrapéritonéale).

Réduction : L'utilisation de l'animal est réduite au maximum et les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Dans cette optique, les expériences sont planifiées et réalisées les unes après les autres afin d'éviter de programmer des séries inutiles. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement). Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons est extrait de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : l'application de la politique de réduction mise en place permet d'optimiser au mieux chaque expérimentation afin de retirer d'un minimum d'animal un maximum d'information. De plus la formation des personnes habilitées à manipuler les animaux et la diffusion par ces personnes de leur savoir dans des conditions appropriées (temps de formation respecté) permet de réaliser nos expérimentations animales dans le respect de l'animal et des conditions optimales du suivi des règles d'hygiène et de sécurité. Tous les animaux sont hébergés dans un service de zootechnie ayant un environnement enrichi qui a été agréé par le ministère.

7629 La santé de l'animal a une influence sur sa production laitière et le maintien de cette production lors de lactation successive. Cependant l'ensemble des mécanismes moléculaires responsables n'est pas connu. Des modifications épigénétiques, c'est à dire des changements dans l'activité de gènes, conduits par des mécanismes autres que ceux affectant la séquence de l'ADN pourraient être impliqués.

Nous souhaitons mieux comprendre l'influence des mammites, inflammation de la mamelle, sur la capacité de production de lait, en nous intéressant plus particulièrement aux modifications épigénétiques qui peuvent être à l'origine de perturbation de la production et de la composition du lait. Ces modifications initiées à un moment donné peuvent perdurer durant toute la vie de l'animal, c'est pourquoi nous nous proposons d'étudier ces phénomènes lors de la 1ère lactation, puis lors de la 2nde lactation. L'étude de ces effets à long terme de l'inflammation mammaire, lors de processus biologiques complexes tels que la lactation, ne peut pas être envisagé via des méthodes alternatives à l'expérimentation animale.

Nous étudierons donc les variations de méthylation de l'ADN, d'expression des microARNs et des ARN messagers dans la glande mammaire murines après induction de mammites par infection locale ou non de la mamelle, à 10 jours de lactation en 1ère lactation, d'une part, et en 2nde lactation, d'autre part. Le lait sera aussi analysé du point de vue de sa composition. Le protocole d'induction locale de mammites a fait l'objet de publications et ne semble pas engendrer de douleurs ou de complications chez les femelles allaitantes.

Ce projet nécessite l'utilisation de 160 souris femelles de souche FVB/N. Les mammites seront artificiellement obtenues par injection, au 7ème jour de lactation, d'antigène dans les tétines. 40 femelles ne seront infectées ni en 1ère lactation, ni en 2nde lactation ; 40 femelles seront infectées en 1ère lactation, mais pas en 2nde lactation ; 40 femelles seront infectées en 1ère lactation et en 2nde lactation ; 40 femelles seront infectées uniquement en 2nde lactation.

La réduction du nombre d'animaux passe par une utilisation des mâles (40) pour plusieurs accouplements, un retour dans l'élevage de ces derniers en fin de projet ainsi qu'une réflexion sur le nombre minimum d'animaux à inclure dans l'étude pour générer un nombre de données suffisantes pour effectuer des analyses statistiques fiables. Les biopsies mammaires ainsi que les prélèvements de sang et de lait seront réalisés, au 10ème jour de lactation, sur des souris anesthésiées et analgésiées afin de minimiser toute souffrance. Les femelles seront euthanasiées suite aux prélèvements réalisés en seconde lactation. Les descendances seront euthanasiées au 10ème jour de chaque lactation. Dans un souci de raffinement les souris seront hébergées à plusieurs par cage afin d'éviter le stress dû à l'isolement, puis isolées à partir de la gestation. De plus afin d'enrichir leur milieu de vie et de permettre la construction d'un nid, des morceaux de sopalin seront ajoutés dans leurs cages.

7630 La ricine et l'abrine sont des toxines végétales extrêmement toxiques considérées comme des armes potentielles de bioterrorisme. La ricine est classée dans la catégorie B des agents bioterroristes dans la liste du CDC (« Centers for Diseases Control and Prevention ») aux Etats-Unis. Il n'existe actuellement aucune contre-mesure médicale en cas d'intoxication par ces toxines. Ce projet s'inscrit dans un programme gouvernemental de recherche et de développement de lutte contre le terrorisme nucléaire, radiologique, biologique et chimique (programme NRBC).

Des molécules (chimiques ou biologiques) inhibitrices de la ricine ont été développées et caractérisées. Encore faut-il disposer de tests de diagnostic qui permettent d'identifier la ricine comme responsable d'une intoxication pour utiliser ces molécules efficacement en traitement. Il est donc nécessaire de disposer de tests diagnostiques performants (sensibles et spécifiques) pour repérer la présence de toxines. L'évaluation des performances des tests de diagnostic rapide d'une intoxication à la ricine ou à l'abrine développés dans notre laboratoire, ainsi que l'efficacité des molécules thérapeutiques, nécessitent un modèle *in vivo* d'intoxication à la ricine ou l'abrine. Il s'agit notamment de déterminer quelles sont les quantités de toxines effectivement décelables dans les fluides biologiques. Ces mesures ne peuvent être réalisées qu'*in vivo* du fait de la diffusion des molécules dans tout l'organisme. Concernant les molécules thérapeutiques (anticorps et molécules chimiques) d'ores et déjà évaluées et sélectionnées *in vitro*, il s'agit maintenant de les évaluer *in vivo*, afin de prendre en compte leurs paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Le projet a donc pour but :

- d'évaluer des tests rapides de détection (ELISA et bandelettes) de ces deux toxines dans les fluides biologiques après leur administration,
- d'évaluer l'efficacité de molécules thérapeutiques pour traiter une intoxication avec chacune des toxines.

Il sera réalisé sur un modèle rongeur, né et élevé dans des établissements agréés à des fins scientifiques. Leur nombre de 4986 a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats interprétables d'un point de vue statistique. L'administration des toxines ainsi que des molécules thérapeutiques sera réalisée sous anesthésie. L'état de santé et le bien-être des animaux, hébergés en groupes, seront surveillés tout au long de l'expérience et évalués grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Dans ce cas, des protocoles d'analgésie réfléchis au préalable, seront mis en œuvre pour soulager les animaux. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le vétérinaire de l'installation sera alors alerté afin de mettre en

œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Dans le cadre du bien-être animal, des modules seront ajoutés dans les cages d'hébergement afin de varier les activités des animaux.

7631 Les cellules cancéreuses se distinguent des cellules normales par leur instabilité génétique. Ce phénomène d'instabilité est plus au moins important selon le type de tumeurs. Nous sommes intéressés à l'étude du cancer du côlon de type MSI (pour Microsatellite instable). Ces cancers surviennent à la suite du dysfonctionnement du système de réparation de l'ADN appelé MMR, normalement responsable du maintien de l'intégrité du génome. Les cellules cancéreuses MSI accumulent des ARN messagers aberrants portant un codon stop prématuré dans leur séquence, ce qui induit la production de protéines tronquées mutantes qui sont reconnues comme « étrangères » par le système immunitaire.

Il est connu que les cancers de type MSI sont de meilleur pronostic par rapport aux tumeurs de type non MSI (ou MSS pour Microsatellite Stable) caractérisés par une instabilité chromosomique. L'origine de cette instabilité chromosomique semble être liée aux mutations du gène APC (pour Adenomatous Polyposis Coli) qui joue un rôle majeur dans le contrôle de la prolifération cellulaire ainsi que la stabilité génomique.

Il a été suggéré que le meilleur pronostic des patients atteints de tumeurs MSI par rapport aux patients avec un cancer MSS soit lié entre autre, à une forte infiltration lymphocytaire de la tumeur MSI et indiquant une meilleure réponse immunitaire.

Il a été démontré que les patients atteints de cancer colique MSI à un stade métastatique présentent une meilleure réponse au traitement avec le pembrolizumab, un inhibiteur du système de surveillance du système immunitaire qui induit une répression de la réponse immunitaire si celle-ci est trop importante (ce système est aussi appelé checkpoint immunitaire). Une forte activité de ce système de surveillance de la réponse immunitaire aurait un effet pro tumorale car les cellules cancéreuses échapperaient au contrôle du système immunitaire.

Dans la littérature il a été suggéré que certaines mutations induisaient une dérégulation de ce système ICK dans les tumeurs primaires de cancer coliques. Nous avons choisi 4 gènes dont les mutations pourraient impacter l'expression ICK et donc de la réponse immunitaire anti tumorale. Notre objectif est de démontrer qu'*in vivo* l'inhibition de ces gènes induit la dérégulation ICK en impactant donc la réponse immunitaire et le développement tumorale.

Le modèle murin a été choisi car nous disposons d'une lignée cellulaire de cancers coliques murins issus d'une souche de souris Balb/c où les 4 gènes ont été inactivés, mimant ainsi la mutation retrouvée chez les malades. Ce modèle est donc disponible et maîtrisé par le laboratoire. Durant le projet, nous estimerons la progression tumorale à l'aide des mesures de la taille de la tumeur. Les tumeurs seront ensuite prélevées pour évaluer la réponse immunitaire via des expériences d'immunohistochimie sur des marqueurs immunitaires bien spécifique.

Nombre/Type d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation de 110 souris commerciales Balb/c : 20 souris pour chaque gène à investiguer (N=4) plus le groupe contrôle, et 10 souris pour une expérience pilote qui nous aidera à choisir les meilleures conditions expérimentales. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment. Il repose sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Les questions scientifiques posées au sein de ce projet ne peuvent être abordées qu'à travers l'étude d'organisme vivant dans leur ensemble. Le nombre d'animaux requis a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise 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. 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.

7632 D'origine infectieuse ou liées à la consommation excessive d'alcool ou de régime alimentaire riche en graisses, les maladies du foie deviennent souvent chroniques avec un risque de développement de cancer du foie grave et préoccupant en terme de santé publique. Afin d'améliorer la connaissance de ces maladies, notre équipe se consacre à la caractérisation des facteurs moléculaires et cellulaires impliqués dans le développement et la régulation de ces maladies du foie que l'on appelle hépatites. Notre équipe a récemment obtenu des données qui suggèrent qu'une protéine impliquée dans le contrôle de la mort des cellules, la kinase intracellulaire dénommée RIPK1, serait essentielle dans la sensibilité des cellules du foie à plusieurs facteurs de mort à l'origine du processus pathologique. Notre projet est d'étudier le rôle de cette kinase RIPK1 dans l'hépatite virale en comparant le développement de l'infection et de la maladie chez des souris normales et des souris n'exprimant pas la kinase RIPK1 dans les cellules du foie. Les événements étudiés ayant lieu dans la première semaine du développement de la maladie, les animaux infectés seront étudiés pendant 5 jours. Les organes (foie, rate, cerveau) prélevés seront analysés par différentes méthodes pour quantifier l'atteinte hépatique et l'avancée des processus de mort cellulaire dans le foie. Le nombre de souris engagées dans ces expériences est évalué au nombre de 48, nous avons pensé ce protocole en suivant la règle des 3 R « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

- Nous avons réduit le nombre de souris à celui requis pour obtenir une validation statistique des résultats ; et nous avons envisagé plusieurs mesures sur les échantillons prélevés au niveau des 2 organes touchés par la maladie pour ainsi récolter un maximum d'informations qui viendront compléter celles déjà obtenues.

- Nous avons raffiné le protocole en prenant soin d'ajouter dans la cage des souris infectées un bloc de gélose humide pour leur permettre de se restaurer alors qu'elles auront une fièvre élevée du fait de l'infection virale. Les injections seront réalisées par voie intrapéritonéale par un chercheur expérimenté capable de contenir les souris de façon ferme mais non-stressante avec un geste précis pour l'injection dans une pièce dédiée.

- Il faut noter qu'il n'existe aucun moyen de remplacer de telles études qui englobent l'ensemble de l'organisme dans sa réponse physiopathologique, et que seule l'expérimentation animale permet un suivi complet de la maladie depuis ses phases les plus précoces et permet d'étudier la réponse physiologique d'un individu déficient pour une molécule d'intérêt pour évaluer son rôle.

Ce travail permettra de préciser de la molécule RIPK1 dans la mise en place de la maladie « hépatite virale » chez la souris. A terme, les données de ce travail pourraient permettre de développer de nouvelles stratégies de traitement des maladies du foie, basées sur l'utilisation de nouveaux inhibiteurs pharmacologiques de la molécule RIPK1.

7633 L'infection par le virus Chikungunya (CHIKV) entraîne des atteintes articulaires, souvent très invalidantes, auxquelles s'associent des maux de tête, accompagnés de fièvre, des douleurs musculaires importantes, une éruption cutanée au niveau du tronc et des membres, une inflammation d'un ou plusieurs ganglion(s) lymphatiques cervicaux ou encore une conjonctivite. En outre, des formes sévères ont été observées au cours de l'épidémie de 2005 survenue sur l'île de La Réunion. Il s'agit alors de formes neurologiques graves, notamment des méningo-encéphalites et des atteintes des nerfs périphériques. Le risque de morbidité associé à l'infection par le CHIKV est de 1 pour 1000 personnes infectées. Plusieurs épidémies ont eu lieu durant la dernière décennie, notamment en Amérique (dont aux Antilles, et l'épidémie s'est étendue sur le reste du continent), en Afrique, en Asie (principalement au sud) et Océan Indien. A ces nombreuses épidémies en région tropicale/subtropicale, s'ajoutent des cas d'infection autochtones décelées de plus en plus fréquemment notamment en France depuis 2010.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement ni de vaccin contre ce virus. Il est donc urgent et crucial de développer des traitements thérapeutiques, ce qui requiert une meilleure connaissance de l'infection par CHIKV, la réponse immunitaire de l'hôte et la pathogénèse. Le virus circule notamment chez les oiseaux et rongeurs. Il est transmis à l'Homme principalement par piqûre de moustiques (du genre *Aedes*). Le virus infecte, initialement, les cellules résidentes de la peau, puis se propage dans le reste de l'organisme. Les symptômes de l'infection sont, en grande partie, attribuables à la première ligne de défense immunitaire de l'hôte, appelée la réponse innée. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes (pDCs) sont des cellules de l'immunité innée qui ont un rôle clé pour contrer les infections. En effet, elles détectent les composants viraux et, en réponse, sécrètent des molécules antivirales, telles que l'interféron.

Notre projet vise à déterminer le rôle des pDCs au cours de l'infection par CHIKV. Les méthodes d'étude *in vitro* ne permettent pas d'examiner la contribution de la réponse innée dans la régulation l'immunité de l'hôte et donc le contrôle de l'infection. Afin de comprendre l'importance des pDCs dans la réponse immunitaire contre CHIKV, il est donc nécessaire d'utiliser un modèle animal comprenant les différents acteurs du système immunitaire. Ainsi, seule l'étude de modèle *in vivo* permet de comprendre l'importance des pDCs, intégrée dans la réponse immunitaire, contre CHIKV.

Le nombre total des souris prévu pour la réalisation de ce projet est de 380. Ce nombre inclut un groupe de souris génétiquement modifiées permettant de définir la contribution des pDCs (souris déficientes ou non pour la réponse immunitaire réalisée par les pDCs), ainsi que des groupes contrôles nécessaire pour la comparaison, et donc l'interprétation des résultats. Autant que possible, et par mesure de remplacement, nous favoriserons l'étude de la réponse cellulaire des pDCs par des expériences *in vitro* utilisant des cellules isolées, plutôt que des expériences sur l'animal. Le nombre de souris utilisées, a été réduit au maximum tout en permettant des analyses statistiques (test Anova). Les études ont été conçues conformément au principe de raffinement, à savoir le minimum de manipulations des souris sera réalisé et un plan de surveillance et de traitement de souffrance des animaux sera mis en œuvre. Notamment, la manipulation des souris se limitera à l'injection d'anesthésiant, l'infection et l'injection d'anticorps pour certains groupes d'animaux, suivie de l'euthanasie après un intervalle de temps réduit (maximum de 48H après infection).

Selon l'expérience de nos collaborateurs, l'infection par CHIKV dans ces modèles pour une durée d'un maximum de 48 heures (qui est la durée maximal d'infection envisagée pour nos expériences) peut causer douleur et/ou un inconfort (tel qu'une faiblesse légère à modéré de membres postérieure et élévation de température dans le modèle « IFR3/7 DKO »). Les animaux infectés resteront donc en observation pour une surveillance des symptômes cliniques de l'infection.

7634 Grâce à ses nombreuses qualités organoleptiques et atouts économiques, le sandre *Sander lucioperca* pourrait constituer une voie stratégique de diversification de l'aquaculture continentale européenne. La culture intensive de ce poisson est récente et de nombreuses populations d'origines différentes et de niveaux de domestication variés sont élevées. De manière générale, chez les poissons d'élevage, il est défini que la domestication est un processus important pouvant réduire le stress et améliorer le statut immunitaire.

Cependant, le développement de l'élevage du sandre est limité par une perturbation de la vitesse de croissance et une forte mortalité. Les conditions d'élevage sont peu optimisées et l'espèce subit de nombreux stress. La réponse au stress relative à ces procédures d'élevage et aux conditions environnementales pourrait donc être une des causes majeures limitant le développement de la productivité de cette espèce en conditions intensives d'élevage. Un intérêt se porte dès lors sur l'étude de l'importance de l'effet de la domestication et de l'origine géographique sur la réponse au stress et le statut immunitaire du sandre.

Cette étude vise à évaluer le niveau de stress et le statut immunitaire de populations issues de deux régions géographiques ainsi que de deux niveaux de domestication. Ainsi, 3 lots de poissons ont été rassemblés au stade larvaire dans des installations d'élevage afin que ces dernières soient élevées jusqu'au stade juvéniles dans des conditions similaires. Parmi ces lots, il y a 2 souches différentes et, pour l'une des deux souches, un niveau de domestication F0 (maintenus depuis le stade larvaire en circuit fermé et issus de géniteurs élevés en étang) et un niveau de domestication F4 (4ème génération sous captivité en circuit fermé). Pour la deuxième souche, les poissons seront également

de niveau de domestication F0 (maintenus depuis le stade larvaire en circuit fermé et issus de géniteurs élevés en étang).

Le protocole expérimental *in vivo* comprendra 9 unités expérimentales et durera deux mois. Le nombre total de poissons sera de 2400. Chacun des 3 lots de poissons seront divisés dans 3 bassins et toutes les conditions d'élevage seront identiques. Au cours de la période expérimentale, divers organes seront prélevés en deux phases sur 72 juvéniles en vue d'évaluer les paramètres physiologiques et immunitaires ; un nombre minimum a été estimé par unité expérimentale. Ce nombre d'individus par groupe a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique a priori suffisante mais aussi nécessaire pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (réduction). En parallèle, l'utilisation de modèles cellulaires ou moléculaires afin de remplacer les animaux d'expérimentation par des modèles *in vitro* n'est pas possible (remplacement). Des juvéniles (2328 ; c'est-à-dire 776 individus par lot) supplémentaires seront utilisés afin d'optimiser le bien-être des poissons car une faible densité est défavorable pour la croissance et le comportement des espèces grégaires comme le sandre. Ces individus supplémentaires seront gardés en vie à la fin de l'expérimentation. Au cours de l'expérience, l'apparition des points limites (changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire, apparition de nécroses ou de champignons) sera surveillée et toute souffrance de l'animal déclenchera sa sortie de l'expérience (raffinement).

7635 Il est maintenant admis que la vaccination est l'une des plus grandes réussites médicales de par l'impact qu'elle a exercé et continue à exercer sur la santé publique. C'est également l'une des interventions médicales les plus rentables en termes de réussite. Son but est de générer des cellules dites « à mémoire » capables d'initier une réponse immunitaire amplifiée et accélérée lors d'une exposition à un agent pathogène ou à une toxine. L'une des fonctions de la mémoire immunologique est donc d'augmenter le niveau de protection de l'hôte vis à vis des infections microbiennes. La réponse anticorps (Ac), qui constitue l'un des bras de l'immunité, nécessite généralement la coopération de deux types cellulaires tous deux susceptibles de donner naissance à des lymphocytes à mémoire : les lymphocytes B et les lymphocytes T.

L'une des avancées fondamentales récentes dans le domaine de la mémoire immunologique fut la découverte que les compartiments lymphocytaires T et B à mémoire comportent plusieurs sous-populations exerçant des fonctions distinctes. Certaines d'entre elles ont une capacité d'auto-renouvellement et permettent de maintenir l'effectif des cellules à mémoire au cours du temps. D'autres sont programmées pour donner rapidement naissance à des cellules effectrices (c'est à dire productrices d'anticorps, dans le cas des lymphocytes B) et permettent d'éradiquer rapidement l'agent pathogène lors d'une réinfection. Enfin, la fonction d'une partie d'entre elles demeure à ce jour inconnue.

Le vaccin idéal est celui qui permettra de générer une protection à la fois efficace et durable (si possible pour toute la vie de l'individu). Or il existe par exemple de grandes disparités entre les vaccins existants en ce qui concerne la longévité de l'immunité qu'ils confèrent. Ainsi, le vaccin rougeole confère une protection à vie tandis que les vaccins contre le tétanos et la diphtérie par exemple n'induisent qu'une protection limitée dans le temps (10 ans en moyenne). L'une des causes de cette disparité pourrait résider dans la composition du vaccin et plus précisément dans la nature d'une substance appelée adjuvant, co-administrée avec l'antigène (Ag), qui permet de stimuler la réponse du système immunitaire lors de la vaccination. Il existe de nombreux adjuvants et ceux-ci peuvent varier d'un vaccin à l'autre. Notre hypothèse de travail est que ces différents adjuvants n'ont pas tous la même capacité à générer les différents sous-types de cellules à mémoire nécessaires pour assurer une immunité protectrice optimale.

Notre projet a pour objectif de comparer 4 adjuvants distincts, déjà utilisés ou pressentis pour de nouveaux vaccins, pour leur capacité à induire les différents sous-types cellulaires qui composent les compartiments lymphocytaires T et B à mémoire. Dans ce but, nous utiliserons la protéine ClfA (Clumping Factor A) issue de la bactérie *S. aureus*, comme Ag modèle. Cette protéine est l'un des facteurs de virulence de la bactérie et fait partie des Ag envisagés comme candidat vaccin contre ce pathogène. Cet Ag sera combiné à chacun des 4 adjuvants évoqués ci-dessus et administré comme vaccin à des souris. Nous déterminerons :

- la composition des compartiments B et T à mémoire induits par chacune de ces 4 formulations vaccinales,

- si la composition des compartiments B et T à mémoire affecte l'efficacité et la longévité de l'immunité vaccinale en exposant les animaux vaccinés à une infection à *S. aureus*.

Ce projet vise donc à obtenir une meilleure connaissance des mécanismes biologiques par lesquels les adjuvants modulent l'efficacité de la réponse vaccinale. Nous espérons qu'il permettra également de fournir des critères objectifs de choix des adjuvants en fonction du type d'immunité désirée. Le recours à l'expérimentation animale pour ce projet se justifie tout d'abord par le fait que la complexité de l'environnement tissulaire et du réseau d'interactions cellulaires impliquées dans la différenciation des lymphocytes à mémoire ne peuvent pas être reproduits *in vitro*. Par ailleurs, la réalisation d'expériences à l'échelle de l'animal est nécessaire pour estimer l'efficacité vaccinale des différentes formulations antigéniques envisagées. Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 1024 souris pour l'ensemble des procédures expérimentales. Pour satisfaire la règle des 3 « R », nous avons :

- réduit le nombre d'animaux en expérimentation en utilisant les mêmes souris pour analyser plusieurs paramètres distincts de la réponse immunitaire,

- raffiné la méthodologie pour réduire au maximum la souffrance animale en proposant un suivi régulier des animaux en expérimentation afin de repérer précocement les signes de souffrance et y mettre fin si nécessaire et en restreignant au maximum les procédures génératrices de souffrance,

- remplacé le recours aux animaux chaque fois que cela était possible en développant au maximum des tests *in vitro* pour mesurer différents paramètres de la réponse immunitaire sans avoir à sacrifier les souris.

7636 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 biotechnologies tente d'évaluer l'activité tumorigène des chimiokines. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ces acteurs présente donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre une chimiokine et l'un de ses récepteurs. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêts à des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique).

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'AcM 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 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 13 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir été placé en quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le 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.

7637 Ce projet éducatif s'inscrit dans le cadre d'une UE qui est dispensée en 3ème année de la licence Sciences du Vivant et de l'Environnement, intitulée "Principes et Techniques de l'Expérimentation animale". Cette UE optionnelle permet aux étudiants de s'initier à la contention, à l'anesthésie et à l'expérimentation sur l'animal (EA), d'étudier la réglementation en EA et d'être sensibilisés à l'éthique dans ce domaine. Le caractère optionnel de cette UE vise à limiter le nombre d'animaux utilisés par rapport au nombre qui serait utilisé dans le cadre d'une UE obligatoire et permet de s'adresser à des étudiants volontaires et motivés qui envisagent de poursuivre leurs études dans des secteurs où l'EA est utilisée.

Cette UE n'est constituée que de travaux dirigés (14H) et de travaux pratiques (16H).

Au cours des travaux dirigés, sont abordées la réglementation et l'éthique en matière d'expérimentation animale et sera donné un aperçu des différentes techniques habituellement pratiquées sur des animaux de laboratoire.

Les travaux pratiques réalisés sur des rats, seront divisés en 4 procédures expérimentales :

- deux procédures permettant aux étudiants de se former à la contention des animaux, l'injection de produits anesthésiques et/ou antalgiques par voie différentes voies d'administration, la pose de cathéters artériels et veineux, le prélèvement de sang suivi de mesures cliniques sur des rats adultes.
- une procédure visant à réaliser la castration de mâles prépubères permettant d'étudier l'impact hormonal sur le comportement
- une procédure visant à étudier le comportement moteur, sexuel et l'anxiété des animaux castrés dans la procédure précédente et les comparer à des mâles non castrés et à des femelles.

L'ensemble des connaissances acquises en TD seront appliquées au cours de ces travaux pratiques par les enseignants. Les aspects statistiques concernant l'exploitation des résultats expérimentaux et leur utilisation pour la mise au point du protocole expérimental seront également enseignés.

Pour les 2 premières procédures, 2 rats par binôme sont utilisés et le nombre total de rats utilisés varie en fonction du nombre de binômes (10 à 15 binômes/an en fonction des années), soit entre 20 et 30 rats/an et entre 100 et 150 rats sur 5 ans. Pour les 2 autres procédures (castration et analyse comportementale), 3 groupes de 20 rats soit 60 rats/an et 300 rats sur 5 ans sont utilisés.

Pour les 3 procédures, les animaux sont anesthésiés en phase 3 profonde de l'anesthésie. Les animaux ne présentent aucune réponse consciente ou inconsciente à tous stimuli. La profondeur de

l'anesthésie est vérifiée par pincement interdigital de la patte postérieure. Si l'animal montre un retrait de la patte (mouvement réflexe) ou tout mouvement volontaire, considérés comme un point limite de souffrance, 1/3 de la dose de l'anesthésique est ajouté.

Au réveil et les jours suivants (pour la procédure 3), les animaux sont traités par gavage pendant 4 jours avec un AINS ayant des propriétés anti-inflammatoires, analgésiques et antipyrétiques. Les animaux sont observés quotidiennement. Si les animaux présentent un comportement anormal, essentiellement une prostration ou au contraire une hyperactivité, pouvant être dû à une infection de la plaie, une 2ème dose d'AINS sera donnée dans la journée en gavage et le vétérinaire référent consulté. A la fin des 2 premières procédures, les animaux seront euthanasiés avec une surdose d'anesthésique. A la suite des procédures 3 et 4, les animaux pourront être réutilisés (principe de réduction).

7638 Dans le cadre de la fabrication d'un médicament dont l'indication est le traitement des allergies en médecine humaine, le dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) nécessite l'utilisation de tissu pulmonaire de rongeurs ayant présenté une réaction allergique.

Cette procédure est décrite dans la littérature et dans le dossier d'AMM déposé auprès des autorités, il n'y a pas à ce jour de méthode *in vitro* équivalente validée.

L'objectif de ce projet est de déclencher une réaction allergique chez des cobayes sous anesthésie. Le tissu pulmonaire est ensuite récolté pour entrer dans la préparation d'un médicament dont l'indication est le traitement des allergies chez l'homme. Lors des essais, les animaux seront maintenus en groupes sociaux selon la réglementation et de l'enrichissement leur sera fourni. Une observation journalière des animaux est réalisée depuis leur réception jusqu'à la fin de l'étude afin de garantir leur bien-être tout au long de l'étude.

La quantité d'animaux utilisés est estimée à 5 cobayes par an, soit 25 cobayes pour la durée totale du projet.

7639 La recherche préclinique pour le développement de dispositifs médicaux innovants et moins invasifs est en pleine croissance. Chaque année de nouvelles solutions technologiques implantables sont disponibles pour les professionnels de santé en particulier dans les domaines de la cardiologie, de la gastro-entérologie, la neurologie et l'urologie. Ces dispositifs permettent de compenser, compléter ou remplacer les fonctions vitales d'un organe défaillant pour prolonger la survie des patients et leur confort de vie.

Préalablement aux implantations, les professionnels de santé ont l'obligation de se former à l'utilisation de ces nouveaux dispositifs en toute sécurité. Ce projet vise à former ces professionnels aux nouvelles techniques d'introduction et de délivrabilité, de navigation, de contrôle et de suivi par imagerie fonctionnelle. Les sessions de formations pluridisciplinaires sont conduites et encadrées par des équipes spécialisées (anesthésistes, chirurgiens et radiologistes) sur modèles animaux pris en charge comme des patients dans des conditions comparables à un bloc opératoire hospitalier. Le projet prévoit donc le recours à des modèles ovins, porcins, canins, et bovins justifiés par des organes de taille et fonctions proche de ceux de l'Homme, avec au maximum respectivement 350, 200, 30 et 20 individus. Le nombre d'animaux a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs pédagogiques pour les professionnels.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Les procédures expérimentales sont classées légères à sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validés par une équipe de vétérinaires afin de garantir le bien-être animal.

7640 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. Certains cancers primitifs ont une propension plus élevée que d'autres à métastaser dans les poumons (par exemple, les cancers du sein, du côlon, de la prostate, du pancréas, du rein, de la thyroïde, de l'estomac, de l'ovaire, les mélanomes).

Le projet consiste à évaluer les effets anti-tumoraux de différentes approches thérapeutiques comme la chimiothérapie, l'immunothérapie et la radiothérapie (en association ou non) dans des modèles expérimentaux de tumeurs pulmonaires primitives ou de métastases pulmonaires induites par l'inoculation intratrachéale de cellules tumorales chez la souris. Après inoculation, les cellules tumorales vont former des tumeurs dans les différents lobes du poumon.

Après implantation des cellules, les souris seront suivies cliniquement pendant une période variable, allant de quelques semaines à plusieurs mois, en fonction de la cinétique de croissance tumorale *in vivo* des cellules implantées ainsi que de l'apparition des signes cliniques associés à la tumeur.

Selon les cas, un suivi longitudinal et non-invasif de la croissance tumorale pourra être réalisé par l'utilisation des techniques d'imagerie optique comme la bioluminescence et la fluorescence *in vivo*.

En cours de suivi, des prélèvements de sang pourront être réalisés. 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.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 800 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle approche thérapeutique 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, la souris est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives et moins douloureuses possibles (par exemple l'imagerie)
- la mise en place de points limites adaptés et le suivi des signes cliniques
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- Le suivi post-anesthésie de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

7641 La bronchiolite est une pathologie des voies respiratoires causée par le virus respiratoire syncytial (RSV). Cette maladie est une cause majeure de maladie grave des voies respiratoires inférieures chez les jeunes enfants, les personnes âgées et les personnes immunodéprimées à travers le monde. Environ 3,4 millions d'enfants âgés de moins de 5 ans sont hospitalisés chaque année pour infection sévère par le RSV, avec le plus grand nombre de cas chez les bébés de moins de 6 mois. Plus de 200 000 morts surviennent chaque année, principalement chez les enfants de moins d'un an et dans les pays en voie de développement

A ce jour, il n'existe pas de vaccin disponible.

Les traitements disponibles se limitent à l'injection d'anticorps neutralisants (immunisation passive) qui réduit de manière efficace la morbidité de la maladie chez l'enfant. Ce traitement est limité à des populations à haut niveau de revenus, en raison de son prix et des difficultés d'approvisionnement.

La prévention de l'infection par le RSV par une approche vaccinale (immunisation active) chez le nouveau-né serait optimale. Cette approche est délicate à mettre en place pour deux raisons : le jeune âge des populations touchées et la survenue de maladies respiratoires (éosinophilies respiratoires aiguës) exacerbées par la vaccination par du virus entier inactivé par le formaldéhyde causant le décès de 2 sujets lors d'une étude clinique en 1967.

Les objectifs principaux du projet sont, dans un premier temps, de développer un modèle animal d'infection par le RSV chez le primate non humain (macaque) nouveau-né et de pouvoir reproduire l'éosinophilie respiratoire aiguë, afin d'être en mesure de la détecter le cas échéant, puis dans un deuxième temps de tester de nouvelles approches vaccinales dans ce modèle.

Le primate non humain ne peut être remplacé. Seul ce modèle permet de reconstituer les interactions entre un pathogène et son hôte et notamment son système immunitaire. La physiologie et le système immunitaire du macaque sont proches de ceux de l'Homme et caractérisés. Aucune méthode alternative n'existe à ce jour. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 9 animaux nouveau-nés accompagnés de leur mère, nés et élevés en captivité dans un établissement agréé. Cela représente un total de 18 animaux. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été ramené au minimum nécessaire pour permettre l'interprétation statistique des résultats.

Une attention particulière est apportée à l'hébergement des femelles gestantes et des nouveau-nés. Les femelles gestantes seront hébergées dans l'animalerie à partir de la fin du deuxième tiers de gestation et les nouveau-nés resteront avec leur mère le temps de l'expérimentation. Si cela est possible, deux reproductrices pourront être hébergées ensemble. Des protocoles d'anesthésie, d'analgésie seront mis en place lors des méthodes expérimentales, toutes conçues pour éviter les souffrances lors des interventions sur les animaux (prélèvements de sang, de fluides, immunisations, infection expérimentale, limitation des volumes de sang prélevés).

La mère sera sous sédatifs tout le temps de l'intervention sur le petit anesthésié, afin de supprimer le stress d'une séparation temporaire. Dans les premières semaines de vie, l'intervention sur le nouveau-né pourra se faire directement sur la mère, sans anesthésie du nouveau-né pour les procédures simples (examen clinique simple, ou micro-prélèvement sanguin). A partir de 3 à 5 semaines, moment où le petit ne reste pas sur la mère, celui-ci sera anesthésié. Le réveil du petit se fera alors en couveuse afin d'assurer un réveil rapide et dans de bonnes conditions. Il ne sera remis avec à sa mère que complètement vigile. Les femelles reproductrices pourront être rendues à l'établissement d'élevage après sevrage ou procédure terminale sur le petit.

Des critères d'arrêt sont prévus afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus (évolution de la maladie, effets secondaires de la vaccination). Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera sollicité afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie. Les animaux bénéficieront du programme d'enrichissement défini par la structure de « bien-être animal » de l'établissement.

7642 Les études prospectives montrent que l'augmentation combinée de la population mondiale et du niveau de vie dans les pays émergents va rapidement et largement accroître la demande en protéines, et plus particulièrement en protéines d'origine animale. En raison de leur composition en acides aminés et de leur digestibilité élevée, ces dernières sont considérées comme une référence en nutrition protéique. Toutefois, parce que leur production est limitée par les ressources en eau, en terres agricoles, et en énergie, mais aussi parce que l'élevage a des effets potentiellement négatifs sur l'environnement, de plus en plus d'attention est accordée à d'autres sources de protéines, telles que les végétaux, ceux-ci pouvant être produits en grande quantité, dans des conditions de culture variées.

L'index de référence pour mesurer la qualité nutritionnelle d'une protéine alimentaire est le DIAAS (pour 'Digestible Indispensable Amino Acid Score') proposé par la FAO (Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture). Il repose sur la composition en acides aminés indispensables (AAI) de la protéine, et sur la biodisponibilité de chacun des AAI. La biodisponibilité des acides aminés

des protéines alimentaires est généralement évaluée par une mesure de la quantité d'acides aminés absorbés avant la fin de l'intestin grêle (digestibilité iléale réelle). Au-delà de la composition en AAI, cette mesure de digestibilité est indispensable pour pouvoir classer les protéines alimentaires les unes par rapport aux autres. Aujourd'hui les seules mesures de digestibilité reconnues par la communauté internationale sont celles réalisées *in vivo*. Le porc est le modèle animal le plus proche de l'homme en ce qui concerne le régime alimentaire et la physiologie digestive. La FAO recommande son utilisation pour les mesures de digestibilité des protéines. Le mini-porc permet de travailler sur des animaux adultes, pondéralement stables.

De nombreuses équipes ont cherché à déterminer la digestibilité protéique via des approches *in vitro* pour limiter le recours aux expérimentations animales. Les dispositifs *in vitro* 'statiques' sont les plus utilisés et ont fait récemment l'objet d'une standardisation par la communauté internationale. Toutefois, même si ces modèles de digestion *in vitro* permettent de retrouver une classification des différentes sources de protéines proches de celles obtenues *in vivo*, les valeurs diffèrent de façon significative. Ces différences s'expliquent essentiellement par le caractère simpliste des modèles *in vitro* statique qui n'intègrent pas le caractère dynamique de la digestion (flux de l'aliment, évolution du pH, sécrétions gastriques et pancréatiques...). Le simulateur de digestion DIDGI®, nouvellement développé, comporte 3 compartiments (estomac et intestin grêle divisé en 2 compartiments distincts) et une série de pompes qui permettent d'assurer le transit de l'aliment dans le tube digestif, la régulation du pH, l'injection des enzymes digestives et de la bile en temps réel. Le tout est piloté par un logiciel qui permet d'enregistrer de nombreuses données au cours du processus digestif (volumes d'aliment, de sécrétions...). Le paramétrage du DIDGI® en termes d'évolution du pH intra-gastrique et du taux de vidange gastrique est crucial pour s'approcher le plus possible d'une digestion *in vivo*.

Le programme mis en place consiste dans un premier temps à fournir les éléments nécessaires au paramétrage du DIDGI® pour l'évaluation la digestibilité des protéines d'origine végétales, puis à valider les résultats obtenus au regard des données obtenues *in vivo*.

L'objectif est à terme de réduire le recours à l'expérimentation animale. Le programme apportera également des données qui font actuellement défauts sur la digestibilité d'aliments protéiques d'origine végétale commercialement disponibles (tofu, seitan, jus de soja).

Les différentes expériences animales réalisées dans ce cadre impliquent la préparation chirurgicale d'animaux (ici le mini-porc) de façon à pouvoir réaliser des prélèvements de contenu digestif (canules à différents niveaux du tube digestif) et d'échantillons sanguins (cathéters permanents). Cette préparation s'effectue sous anesthésie générale, et un protocole médicamenteux est mis en place pour réduire au maximum la douleur et favoriser la récupération post-chirurgicale. Après cicatrisation, la présence de ces dispositifs ne provoque pas de gêne ni de douleur à l'animal. Du personnel formé à ces modèles animaux (chirurgien, personnel technique et scientifique dédié) est présent sur site, et bénéficie d'une longue expérience de ce type d'approches et de mesures. Le fait de pouvoir réaliser les mesures pour chacune des sources protéiques sur les mêmes animaux permet de limiter le nombre total d'animaux utilisés.

Le programme de recherche comprend 3 expériences successives, réalisées sur les 4 sources protéiques testées (tofu, seitan, jus de soja, émulsion de pois). La première permettra un suivi de l'évolution du pH gastrique suite à l'ingestion d'un repas. La deuxième permettra d'évaluer le taux de vidange gastrique. Ces 2 données seront utilisées pour paramétrer le DIDGI®. La troisième sera réalisée pour déterminer la digestibilité iléale réelle des 4 sources de protéines végétales.

Au total 19 mini-porcs seront utilisés pour réaliser ces expériences.

7643 Le 3ème cancer le plus fréquent en France, avec 33 000 nouveaux cas par an, est le cancer colorectal, dont le traitement principal demeure la chirurgie. Un des principaux facteurs de risque de ce cancer est l'inflammation chronique intestinale. Cette inflammation est notamment observée chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), à savoir la maladie de Crohn et la recto-colite hémorragique. Avec le temps, les MICI peuvent entraîner la survenue du cancer colorectal, et elles n'ont à ce jour aucun traitement curatif. En effet, les traitements proposés jusqu'à présent, visent surtout à améliorer le bien-être du patient.

Les cellules immunitaires qui sont responsables de l'inflammation dans les MICI, communiquent avec les milliards de bactéries présentes dans le côlon ou le rectum, qui constituent le microbiote intestinal. Parmi ce microbiote intestinal, il existe un groupe transitoire de bactéries, apportées par administration orale, qui a un effet bénéfique pour l'organisme de l'hôte, ce sont les probiotiques, dont font partie les Lactobacilles. Ces bactéries exercent leurs effets favorables sur l'organisme hôte selon différents mécanismes, dont la modulation de l'activité du système immunitaire intestinal. C'est la compréhension de ce mécanisme, au niveau moléculaire, cellulaire et *in vivo*, qui est au cœur de ce projet.

Ainsi, des travaux menés dans des modèles *in vitro* et *ex vivo* par notre laboratoire, ont permis de montrer que le surnageant de biofilms de *Lactobacillus casei* avait de fortes propriétés anti-inflammatoires, et que ces effets étaient dus à une protéine appelée GroEL. Nous souhaitons donc maintenant confirmer ces propriétés *in vivo*, grâce aux modèles murins à notre disposition : modèles d'inflammation intestinale induite (souris BALB/c et TLR4-/- traitées au Dextran Sulfate de Sodium « DSS », une molécule qui déclenche l'inflammation intestinale), et modèle de grande susceptibilité au cancer colorectal (souris APCMin/+).

L'inflammation intestinale aiguë induite par le DSS se manifeste par plusieurs symptômes, notamment un saignement rectal et une perte de poids, et les souris APCMin/+ développent des polypes intestinaux à partir de l'âge adulte. Toutes les souris seront donc surveillées attentivement pendant la durée de l'étude, et l'utilisation d'une grille de score clinique nous permettra d'avoir une vision globale de leur état de santé, et de prendre les mesures nécessaires pour atténuer toute souffrance ou angoisse. Si les points limites que nous avons établis sont atteints, les souris seront euthanasiées selon l'une des méthodes acceptées par la législation.

Par ailleurs, des mesures seront prises pour améliorer le bien-être des animaux : supplémentation en nourriture gélifiée si besoin, hébergement en groupe et enrichissement structurel du milieu.

Nous évaluons à 132 le nombre total d'animaux nécessaire à l'étude, ce qui correspond au nombre minimal permettant d'obtenir une étude statistique valable avec les tests statistiques que nous avons adaptés à cette étude.

Les résultats obtenus pourraient contribuer au développement d'une approche thérapeutique visant à améliorer la prise en charge des patients atteints par les MICI et le cancer colorectal.

7644 Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul site de l'antigène (appelé épitope). La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope, qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic (pour la réalisation de tests très variés) et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluorescence et en immuno-électromicroscopie. Les AcM entrent également dans la composition des kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération récente de nombreux médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme

une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non-soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer *in situ* comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire. L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classique. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B. L'approche envisagée consiste à immuniser à l'aide de plasmides codant les protéines d'intérêt, des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines), afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Puis, 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'AcM synthétisé par son lymphocyte parental. Les hybridomes génèrent des anticorps spécifiques d'un épitope. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre des structures protéiques particulières, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, la règle des 3R à savoir, Remplacer (utilisation d'une méthode alternative si elle existe pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole en le diminuant le plus possible), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x10). Le temps minimum d'immunisation est de 71 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir passé une période de quarantaine et satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une immunisation intramusculaire par injection au niveau du muscle tibial antérieur sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires. Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le 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.

7645 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radio vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

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

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 500 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R :

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

7646 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiels d'un candidat médicament sur la coordination motrice, et plus spécifiquement si le composé à tester peut altérer le tonus musculaire ou avoir un effet sédatif chez le rat.

Le projet consiste à mesurer la capacité de l'animal à se maintenir en équilibre sur un axe en rotation. Un animal qui présente une coordination motrice altérée tombe plus rapidement de l'axe en rotation qu'un animal normal.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1500 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

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

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux et d'éventuels signes cliniques
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- la recherche des points limites

- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7647 Il est important de vérifier si un candidat-médicament peut induire une hypotension orthostatique, c'est à dire une diminution de la pression artérielle déclenchée par un changement soudain de posture. Cette évaluation est réalisée sur des chiens préalablement instrumentés avec un émetteur de télémétrie permettant de mesurer la pression artérielle chez l'animal vigile.

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

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 80 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les risques d'un candidat médicament à générer des hypotensions orthostatiques. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- La validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- Le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

7648 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité et/ou de l'efficacité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, contractilité et relaxation cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint. L'émetteur de télémétrie implanté chez l'animal permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardiovasculaires sur animal à jeun ou non à jeun et avec ou sans stimulation cardiaque chez le chien vigile chroniquement implanté en utilisant la télémétrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 60 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R :

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est l'espèce recommandée pour ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- la validation du système de télémetrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi de signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7649 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiels d'un candidat médicament sur l'activité motrice spontanée chez le rongeur, pour détecter ses potentiels effets secondaires stimulants (augmentation de l'activité motrice spontanée) ou sédatifs (baisse de l'activité motrice spontanée).

Le projet consiste à mesurer les mouvements/déplacements d'un animal induits par le candidat médicament en utilisant un actimètre, système qui va permettre de mesurer les déplacements de l'animal dans sa cage par l'interruption de faisceaux infrarouges. Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 5000 animaux sur 5 ans (2500 rats et 2500 souris).

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur l'activité motrice. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat et la souris sont les espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7650 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer l'innocuité d'un candidat médicament chez la souris en utilisant le test d'Irwin. Le projet consiste à tester les effets des produits sur le comportement général, les réflexes neurologiques, le poids et la température corporelle chez la souris.

Le test d'Irwin consiste en une batterie d'observations comportementales permettant d'évaluer l'aspect et le comportement général de l'animal, différents réflexes neurologiques ainsi que la température corporelle et le poids suite à l'administration du produit à tester. Ces observations sont répétées dans le temps sur une période totale de 72 heures, période suffisante pour caractériser l'effet du produit.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 2400 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur le système nerveux. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal

constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7651 Chez l'Homme et les animaux de laboratoire, une expérience stressante a un impact majeur sur la physiologie de l'intestin, en modifiant notamment la composition et la structure du microbiote intestinal, qui contribue à augmenter le risque de maladies. Un tel impact n'a pas encore été étudié chez les ruminants qui disposent pourtant d'un microbiote très riche, en particulier dans le rumen, qui influence le métabolisme de l'animal hôte. Une meilleure connaissance des liens entre stress et microbiote chez les ruminants contribuerait à élaborer une gestion intégrée de la santé des animaux en élevage. Par ailleurs, de nombreux travaux chez ces animaux mettent en évidence une forte variabilité génétique dans les réactions au stress, et une sélection génétique de lignées d'ovins présentant des réactions extrêmes en réponse à un stress a pu être mise en œuvre.

Le projet proposé ici utilise 48 agneaux de ces deux lignées divergentes et vise à étudier les effets à court et moyen termes de deux conduites d'élevage contrastées (le milieu de vie répond au mieux aux besoins comportementaux des animaux vs le milieu est associé à différents stress survenant en élevage) sur : i) le microbiote gastro-intestinal, et ii) l'état de bien-être/santé des animaux et leurs performances. L'expérimentation proposée s'intéresse à l'impact de plusieurs facteurs à l'échelle de l'animal vivant et ne peut pas être remplacée par des modèles *in vitro*. Cependant le protocole tient compte des autres critères demandés par la règle des 3R (réduction du nombre d'animaux au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement valides, raffinement des conditions de vie et d'expérimentation des animaux). Bien que s'agissant d'un travail sur le stress basé sur l'application de stressors sur les animaux, on respecte strictement l'espace minimum par animal, une vie en groupe en l'absence de contraintes alimentaires. Un suivi régulier des aspects sanitaires et comportementaux sera réalisé.

7652 Le rétrécissement aortique (RA) est actuellement la valvulopathie la plus fréquente et sa prévalence est élevée (3% des patients âgés de plus de 75 ans ont un RA), et est en augmentation croissante du fait du vieillissement de la population. Le RA est lié à l'association d'une fibrose et d'une calcification des feuillets valvulaires entraînant une réduction progressive de la surface valvulaire. Actuellement, aucun traitement spécifique ne permet de faire régresser ou de ralentir l'évolution de la maladie. Le seul traitement, lorsque le RA est serré et symptomatique, consiste à remplacer la valve native par une bioprothèse, soit par chirurgie conventionnelle, soit par voie percutanée quand le patient n'est pas opérable ou à haut risque chirurgical. Le RA a initialement été considéré à tort comme une pathologie « passive » avec dégénérescence calcaire valvulaire progressive touchant préférentiellement le sujet âgé. En fait, la physiopathologie du RA est beaucoup plus complexe et partage certains points communs avec l'athérosclérose. En effet, les facteurs de risque de ces deux pathologies sont communs : âge, tabagisme, hypercholestérolémie, diabète, et l'association, chez un même patient, d'un RA et d'une maladie athéroscléreuse est très fréquente (> 50%). Afin d'étudier la physiopathologie du RA, plusieurs modèles (souris, lapin, porc) ont été développés grâce à l'utilisation d'un régime riche en cholestérol. Ces modèles entraînent une déposition de lipides dans les feuillets valvulaires et un excès plus ou moins important de collagène et de calcaire dans les feuillets valvulaires mais pas de véritable RA. Plus récemment, un nouveau modèle a été décrit. Il s'agit de souris déficientes pour le récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR). Ces souris

développent un épaississement et une fibrose des feuillets valvulaires. Cependant, la calcification de ces feuillets reste minime et n'entraîne pas de véritable RA.

La présente étude vise à développer un modèle murin de RA fiable et reproductible afin de mieux comprendre la physiopathologie du RA et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques. Pour ce faire, nous optons pour des études chez un modèle murin élevé à des fins scientifiques, caractérisés par une faible variation génétique entre animaux, ce qui conduit à une moindre variabilité de la réponse biologique et permet de réduire le nombre d'animaux nécessaires. Afin que ces animaux développent un RA serré et calcifié, les animaux seront injectés à raison de 3 fois/semaine en Vitamine D3 qui permettra d'induire des calcifications. De plus, les souris bénéficieront d'un régime enrichi en cholestérol afin que ces dernières deviennent athéroscléreuse.

Stratégie des 3R : dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux nécessaire à cette étude, nous réaliserons des mesures non invasives de la fonction valvulaire cardiaque, telles que l'échocardiographie et l'IRM, permettant des mesures répétées sur le même animal. Dans ce même objectif, nous avons mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses *in vitro* permettant de réduire le nombre d'animaux à euthanasier. Dans l'objectif de limiter la douleur dans nos modèles, les animaux seront examinés de façon régulière pour vérifier leur état général de santé. Différents paramètres seront évalués incluant le comportement (mobilité et réactivité normale) ainsi que l'état physique (état de la peau, de la fourrure et des yeux ; vitesse et profondeur de respiration). Leur prise de poids sera également notée régulièrement (initialement de façon quotidienne puis 3 fois par semaine). Afin de limiter l'anxiété des animaux le début des procédures aura lieu 2 semaines après l'arrivée des souris au sein de l'animalerie afin qu'elles aient un temps d'adaptation et de repos suffisant suite au transport. De plus, les manipulations auront lieu dans une pièce calme et isolée en présence d'un expérimentateur unique. Les animaux seront hébergés à raison de 5 souris par cage, dans des cages de dimensions 0.01 m³ (longueur = 37 cm; largeur = 21; hauteur = 13 cm) à fond solide contenant du matériel de nid pour l'enrichissement environnemental. Les animaux bénéficieront d'un accès ad libitum à la nourriture et à l'eau. Si des signes de souffrance apparaissent (toiletage diminué, immobilité, perte de poids) l'animal sera euthanasié. Si la perte de poids continue plus de 6 jours ou si des signes de souffrance sévère ou de détresse apparaissent (perte de poids >15%, paupières fermées, léthargie, comportement de retrait, température corporelle diminuée de 5°C), l'animal sera euthanasié.

Ce travail expérimental s'attache à analyser les déterminants de la physiopathologie *in vivo* et requiert à cet effet l'utilisation d'un modèle animal. Pour ce travail, 311 souris (mâles et femelles) âgées de 6 semaines seront utilisées, nombre défini nécessaire et suffisant pour répondre aux objectifs de l'étude réalisée sur 5 ans, prenant en compte des résultats antérieurs ayant permis de raffiner les aspects techniques et les variabilités inhérente au modèle. Dans l'objectif de réduire le nombre d'animaux nécessaire à cette étude, nous réaliserons des mesures non invasives de la fonction valvulaire cardiaque, telles que l'échocardiographie et l'IRM, permettant des mesures répétées sur le même animal. Dans ce même objectif, nous avons mis en place une stratégie d'optimisation des prélèvements et des analyses *in vitro* permettant de réduire le nombre d'animaux à sacrifier.

Les résultats de cette étude permettront de développer de nouveaux traitements pharmacologiques permettant de ralentir, voire d'arrêter la progression de cette pathologie.

7653 Les mécanismes physiopathologiques associés à la maladie d'Alzheimer (MA) demeurent mal connus. A l'heure actuelle, il n'existe pas de solution thérapeutique satisfaisante pour prendre en charge les déficits cognitifs et neuropsychiatriques associés à la maladie.

Ce projet a pour objectif de tester le potentiel thérapeutique de molécules en développement dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer. Ce modèle repose sur une mutation génétique particulière. Il est bien connu et caractérisé (reconnu comme référence dans la littérature scientifique) et est associé à un déficit cognitif (mémoire) et neuropsychiatrique (agressivité) évaluable grâce à des tests comportementaux de référence.

Deux catégories de souris seront utilisées : les souris non-transgéniques (dits "sauvages" ou "wild type" WT en anglais) et les souris transgéniques.

Elles seront réparties en différents groupes et seront traitées avec la substance test (plusieurs doses), le produit de référence ou le véhicule (groupe contrôle). Des tests comportementaux spécifiques seront ensuite réalisés afin d'évaluer l'effet des candidats-médicament sur la mémoire, l'agressivité territoriale et l'activité locomotrice générale.

Le nombre d'animaux prévisionnel maximum est de 2400 souris sur 5 ans.

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

Remplacement : le projet est réalisé sur la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (expériences *in vitro*) pour évaluer les effets d'un candidat médicament sur les déficits moteurs et/ou non-moteur dans le cadre de la maladie d'Alzheimer. A ce jour, la souris est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

Réduction : un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique. (Raffinement : ce projet fait l'objet de procédures rigoureuses, il est réalisé par un personnel formé attentif à la recherche des points limites et au recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7654 L'épilepsie est une atteinte neurologique se caractérisant par une prédisposition à avoir des crises épileptiques dites « non-provoquées » c'est à dire elles ne sont pas expliquées par un facteur causal. Les désordres de type épileptique représentent l'une des atteintes cérébrales les plus importantes au monde. En effet environ 1% de la population mondiale va dans sa vie avoir une crise d'épilepsie. Au niveau du fonctionnement du cerveau, il est observé lors d'une crise de type épileptique une modification transitoire du fonctionnement d'un ou plusieurs réseaux de neurones qui vont fonctionner de façons synchrones et aberrantes.

L'étiologie des épilepsies est très diverse ; les épilepsies peuvent être d'origine génétique, lésionnelle ou non déterminée. Il n'existe pas une épilepsie mais plusieurs types d'épilepsies. Classiquement deux grandes familles d'épilepsies sont définies ; les épilepsies généralisées ou partielles. Les épilepsies généralisées sont des épilepsies où les deux hémisphères cérébraux sont d'emblés touchés par les décharges épileptiques. Dans le cas des épilepsies partielles, une zone ou population limitée de neurones sont touchées par les crises épileptiques. Malgré le développement de plus de 20 antiépileptiques lors des 30 dernières années, plus de 30% des patients épileptiques n'a pas une épilepsie contrôlée par les antiépileptiques. De plus, les principaux antiépileptiques utilisés en clinique montrent certes une efficacité sur les décharges épileptiques mais provoquent de nombreux effets secondaires comme des pertes de mémoire, ou la sédation. Il apparait donc comme critique de développer de nouvelles molécules antiépileptiques afin de traiter les patients épileptiques résistant aux traitements déjà existants et qui provoquent moins d'effets secondaires.

Dans ce projet, nous nous proposons de tester, sélectionner et valider de nouvelles molécules bioactives développées par les professionnels du médicament dans un modèle de souris mimant une épilepsie focale pharmaco résistante. En effet, nous avons développé un modèle de souris reproduisant les principales caractéristiques histo-pathologiques et électrophysiologiques d'une forme d'épilepsie humaine : l'épilepsie du lobe temporal.

En clinique, les patients souffrant d'épilepsie du lobe temporelle sont résistants aux antiépileptiques et sont traités par deux voire trois antiépileptiques provoquant des effets secondaires très forts et invalidants. Une étude pharmacologique extensive de notre modèle de souris du lobe temporal a montré une certaine résistance à certains antiépileptiques, ceux touchant l'excitabilité cellulaire et une sensibilité aux antiépileptiques ciblant le système inhibiteur du cerveau. Notre modèle de souris d'épilepsie du lobe temporal apparait donc comme un modèle pertinent pour la sélection et la validation de nouvelles molécules antiépileptiques. De plus, nous avons développé des protocoles permettant l'identification et la sélection de composés sur un nombre restreint d'animaux.

Nos protocoles d'études sont basés sur des procédures d'études cliniques en utilisant un plan d'étude croisé. Ce type de protocole permet de réduire le nombre d'animaux et d'augmenter la puissance statistique puisque chaque animal est son propre control.

Ce projet est composé de 5 procédures expérimentales et requerra l'utilisation de 4200 souris au total. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés

tout en préservant la validité des expériences menées. La mise en place d'un état pathologique modéré chez ces animaux est l'aspect le plus dommageable. Cependant, l'état de santé des animaux sera suivi tout au long de l'expérience et évalué grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Dès le moindre signe de souffrance, nous pourrons ainsi intervenir immédiatement et efficacement pour soulager les animaux.

Ce projet a pour but d'évaluer de nouvelles molécules antiépileptiques dans un modèle d'épilepsie pharmaco-résistante. Il n'existe pas de modèle cellulaire pour computationnel pouvant remplacer notre préparation *in vivo*. Ce projet facilitera le développement de nouvelles molécules antiépileptiques plus efficaces et présentant moins d'effets secondaires pour des patients souffrant d'épilepsies non contrôlées efficacement par les traitements actuels.

7655 L'IRM est devenue au cours des années 1980 et 1990 un outil de plus en plus utilisé pour le diagnostic médical, grâce à sa bonne résolution spatiale (submillimétrique), son caractère non-traumatique et sa grande variété de contrastes (T1, T2, densité de protons, coefficient de diffusion, IRM dynamique, IRM fonctionnelle, élastographie, etc.). Ces progrès n'ont pu être réalisés sans d'importants développements méthodologiques. Afin de poursuivre ces avancées techniques, notre projet consiste à développer des stratégies exploratoires, basées sur le caractère non invasif de la RMN, pour analyser les systèmes biologiques dans une réelle approche intégrative en cherchant autant que possible à limiter la perturbation et l'influence de l'exploration sur le comportement du système analysé.

Plus précisément il s'agit d'une part d'optimiser ou de développer de nouvelles séquences en spectroscopie et en imagerie par RMN permettant d'obtenir *in vivo* des informations sur la fonction d'un organe, d'une partie d'un organe ou sur la totalité de l'organisme dans le temps et dans l'espace et de mettre en évidence des dysfonctionnements. Ces méthodes devront à terme pouvoir être utilisées en routine clinique chez l'homme.

D'autre part, dans le cadre de développement de thérapies (cellulaires) ciblées, il est important de perfectionner ou d'inventer des méthodes innovantes de ciblage et de marquage cellulaire et moléculaire qui reposent sur l'existence d'un certain nombre de phénomènes physiques et biologiques qu'il faut convenablement mesurer. Ces méthodes nécessiteront l'injection d'un agent ciblant stable et biocompatible agissant comme des agents de contraste intelligents pour révéler une activité biologique spécifique. Il est également prévu de développer des molécules tenant à la fois le rôle d'agent de contraste et d'agent thérapeutique.

Le nombre total d'animaux envisagé pour les 5 prochaines années est de 410 souris et de 75 rats. Ceci permettra l'étude par IRM de différentes pathologies (comme l'ischémie du myocarde, l'hypertension pulmonaire artérielle et, en oncologie, l'étude de tumeurs primaires et des métastases). Il est indispensable d'utiliser les animaux vivants, car nous souhaitons détecter l'apparition d'une maladie (diagnostic précoce) et ensuite suivre son évolution (pronostic). Des contrôles sains seront nécessaires pour vérifier la validité des diagnostics IRM des animaux pathologiques. Les mêmes animaux seront imagés plusieurs fois avec un minimum de quatre jours entre chaque examen (réduction). Les animaux à pathologies différentes seront gardés dans des cages séparées, contenant des bâtonnets de bois à ronger, matériaux de construction de nid, coton, maisonnette, tubes en carton, de la paille, de la nourriture et de l'eau à volonté. Si certains animaux entrent en état de souffrance, ils pourront être séparés et placés dans des cages individuelles. De plus, l'administration d'un analgésique pourra être envisagée. L'état de santé des animaux sera suivi quotidiennement.

7656 Ce projet a pour but d'évaluer les effets antidépresseurs potentiels d'un candidat médicament chez le rongeur en utilisant un test comportemental de référence largement décrit dans la littérature scientifique : le test de la nage forcée.

Les animaux sont placés dans un cylindre rempli d'eau dont ils ne peuvent pas s'échapper.

Après quelques minutes de nage intense (tentative d'échappement), les animaux comprennent qu'ils ne peuvent pas s'échapper et s'immobilisent à la surface de l'eau (ils ne font plus que de petits mouvements afin de se maintenir à flot).

Il a été décrit que ce comportement correspondait à un état de résignation de l'animal, un symptôme observé chez les patients atteints de dépression.

Dans ce projet, le temps d'immobilité dans le test de la nage forcée sera évalué chez le rat ou la souris après administration aiguë ou répétée de candidat-médicaments ou substances de référence.

L'administration de composés à la propriété antidépresseur permettra de diminuer le temps d'immobilité (diminution de l'état de "résignation").

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1500 animaux sur 5 ans (750 rats et 750 souris).

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour étudier l'impact d'un candidat médicament sur la dépression. A ce jour, le rongeur est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement sera obtenu par :

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- le suivi des signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7657 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

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

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 120 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le chien car il n'existe pas de méthode de substitution (*in vitro* ou *in silico*) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le chien est l'espèce recommandée pour ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux

- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi de signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

7658 A l'heure actuelle, le remplacement des animaux par des méthodes *in vitro* ou *ex-vivo* est limité de par la difficulté de tirer les mêmes conclusions à partir d'un modèle imaginé par les chercheurs sur un être vivant autonome par rapport à une méthode alternative. Afin de développer certaines de ces méthodes alternatives à l'utilisation des animaux en recherche et développement, il est nécessaire de créer des lignées cellulaires ou des organes *ex-vivo* issues d'animaux. Pour obtenir ces éléments biologiques, il est possible de réutiliser les animaux issus d'études ne pouvant pas être remplacés.

Ce projet consiste à prélever en phase terminale des fluides biologiques et des organes chez le chien, le porc et le primate anesthésié.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 75 chiens, 30 cochons et 75 primates non humains sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de méthodes alternatives, ce projet est réalisé chez le chien, le porc et le primate non humain afin de fournir des lignées cellulaires et des organes pour les méthodes *ex-vivo* et *in-vitro* permettant de remplacer les animaux pour les tests préliminaires de recherche. Or, avant toute administration à l'homme, les méthodes *in-vitro*, *ex-vivo* constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité et de la toxicité d'un candidat médicament (si elles existent). A ce jour, le chien, le porc et le primate non humain sont parmi les espèces les plus adaptées à ce type de modèle pour leur proximité phylogénétique avec l'Homme.

- Réduction : Lors de ce projet, les animaux utilisés seront principalement issus de la réutilisation. Ces animaux seront majoritairement des animaux ne pouvant pas être remplacés.

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

- la mise au point de procédures rigoureuses, avec utilisation de moyens antalgiques appropriés
- la formation du personnel permettant d'appliquer les méthodes réglementaires et les bonnes pratiques
- le suivi de points limites et le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7659 Notre projet vise à étudier la relation entre la bioénergétique, le métabolisme et la signalisation cellulaire des tumeurs. Grâce à notre modèle de cellules en culture, nous avons identifié un mécanisme par lequel les cellules cancéreuses du sang changent de métabolisme et qui permet la progression du cancer leucémique aigüe lymphoblastique. La leucémie aigüe lymphoblastique (LAL) est un cancer du sang qui est développé à partir des cellules souches anormales et qui débute soudainement en évoluant très rapidement. Ce type de cancer est le plus fréquemment diagnostiqué chez les enfants mais aussi chez les adultes. En utilisant les souris comme modèle, ce projet est essentiel pour comprendre si le mécanisme identifié est une cible potentielle contre ce type de cancer, comme le traitement de la leucémie aigüe lymphoblastique est un traitement lourd : chimiothérapie ou greffe de moelle osseuse. Nous demandons pour réaliser notre projet 450 souris. Dans le respect de la règle des 3R, nous avons restreint notre nombre d'animaux à utiliser grâce à un suivi longitudinal du développement des tumeurs par imagerie non invasive et aussi par l'utilisation de modèles statistiques adéquats. Nous raffinons notre protocole expérimental en prenant en compte la douleur de l'animal de la naissance à la mort. Le protocole expérimental est raffiné en augmentant et en améliorant la spécificité des mesures expérimentales de manière à mieux évaluer dans le temps et limiter au maximum la durée d'utilisation des animaux. Cependant il ne nous est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux car le modèle étudié, de par sa complexité, n'est pas réalisable *in vitro*. La collaboration entre notre équipe avec l'animalerie A2 permet un suivi des souris

quotidiennement pour mieux prendre soin des souris et détecter et prendre en charge de façon précoce les douleurs apparues après la prise de la greffe.

7660 Chaque étude de ce projet a pour objectif principal de décrire les techniques de prélèvements de sang et de liquide céphalo-rachidien (LCR) chez le rongeur. Au cours de chaque étude de ce projet, des prélèvements de sang et de LCR seront réalisés chez l'animal vigile ou anesthésié après l'administration du candidat-médicament et éventuellement le véhicule ayant servi à préparer la formulation de la molécule testée (en général 4 groupes avec 3 animaux par groupe ; soit un nombre prévisionnel maximum de 900 cobayes + 2700 rats + 3600 souris = 7200 animaux en 5 ans).

Ces prélèvements de sang et de LCR seront utilisés pour mesurer dans le temps la concentration du candidat-médicament administré et/ou de ses métabolites et éventuellement la concentration de différents marqueurs biologiques pertinents.

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rongeur car il n'existe pas de méthode de substitution (expérience *in vitro*) pour étudier la pharmacocinétique d'un candidat-médicament. Or avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. L'étude pharmacocinétique est donc une étape importante, car une molécule peu absorbée ou rapidement éliminée a peu de chance d'être développée. De façon générale, les études de pharmacocinétique sont effectuées chez deux groupes d'animaux, les rongeurs d'une part et les gros mammifères d'autre part (chien, primate non humain).

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
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

7661 Le trouble de stress post-traumatique (TSPT) aussi appelé syndrome de stress post-traumatique ou état de stress post-traumatique, désigne un type de trouble anxieux sévère qui survient à la suite d'un événement perçu comme traumatisant chez l'individu (guerre, catastrophe naturelle, accident grave, agression...). Il se caractérise par l'apparition de plusieurs symptômes qui persistent au cours du temps : intrusions (résurgences et flashbacks de l'expérience traumatisante, cauchemars) ; évitement des souvenirs, des personnes, des lieux et des situations associées à l'évènement traumatisant ; hypersensibilité (irritabilité, nervosité, anxiété, troubles du sommeil) ; et altérations de la mémoire, de l'humeur et des émotions. Il représente un problème non seulement individuel mais de santé publique car souvent associé à de nombreux troubles psychiatriques et médicaux : dépression, anxiété, comportement suicidaire, tendance à la consommation abusive de stupéfiants, problèmes cardiaques, diabétiques et gastro-intestinaux. Malgré les effets délétères de ce trouble, la compréhension actuelle des mécanismes physiopathologiques sous-jacent à son apparition n'a pas permis la mise au point d'une solution thérapeutique efficace. Grâce aux critères reconnus du TSPT chez l'Homme, de nombreux groupes de recherches ont déjà pu développer des modèles animaux, impliquant généralement le rat et la souris, aujourd'hui mis en œuvre avec succès en laboratoire et applicables au développement de stratégies thérapeutiques.

Le but de ce projet est de mettre au point un modèle de TSPT chez le rongeur et de tester des cibles pharmacologiques afin de traiter ce syndrome. Il n'existe pas de méthodes substitutives et les modèles *in vitro* ne permettent pas de modéliser un TSPT, c'est pourquoi un modèle animal doit être utilisé pour la réalisation de ce projet.

L'étude sera réalisée avec le nombre minimal d'animaux nécessaire dans chaque groupe d'études. La mise en place d'un modèle de TPST nécessitera l'utilisation de différentes espèces (rats ou souris), différentes souches et différentes conditions expérimentales. Elle nécessitera donc $n = 2$ (espèces) \times $n = 2$ (souches) \times 24 ($n = 12$ témoins et $n = 12$ TPST) \times 4 (conditions) = 384 animaux utilisés au maximum pour la mise au point du modèle.

Une fois le modèle établi au laboratoire, nous évaluerons les effets de différentes molécules sur le TPST : des molécules de références anxiolytiques et une molécule d'intérêt développée par notre laboratoire. L'anxiété des animaux sera évaluée dans 3 à 5 tests comportementaux classiques et préalablement approuvés par le comité d'éthique. Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, ceux-ci seront impliqués dans différents tests comportementaux. Cette seconde phase du projet nécessitera donc $n = 48$ ($n = 12$ témoins/véhicules, $n = 12$ témoins/molécule, $n = 12$ TPST/véhicule, $n = 12$ TPST/molécule) \times (2 molécules de références (à 3 doses) et 1 molécule développée par notre laboratoire (à 3 doses)) = 432 animaux maximum pour la durée de l'étude. L'ensemble de ce projet nécessitera donc un total de 816 animaux maximum pour une durée de 5 ans. Les animaux feront l'objet d'un suivi attentif et des points limites ainsi que des actions sont définis afin d'agir en cas d'impact sur leur bien-être. De plus, les animaux sont hébergés en groupes et dans un milieu enrichi afin de limiter leur stress en dehors des expériences.

7662 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 d'enzymes présentes dans le microenvironnement tumoral. Lors de précédentes études, notre laboratoire a démontré l'activité d'un vecteur anticancéreux *in vivo* chez la souris. Afin de rendre son activité anti-tumorale encore plus spécifique et permettre de libérer localement la molécule au niveau de la tumeur, nos partenaires ont enfermés les agents anticancéreux vectorisés dans des gouttes sensibles aux ultrasons. A l'aide d'une impulsion d'ultrasons, nous sommes en mesure de faire éclater les gouttes sur une zone extrêmement restreinte afin de libérer le médicament vectorisé. Cette stratégie devrait nous permettre de réduire les effets secondaires des chimiothérapies grâce à un double système de ciblage tumoral : l'impulsion d'ultrasons pour libérer l'agent anticancéreux vectorisés et les enzymes du microenvironnement pour activer ce dernier et restituer un médicament pleinement actif directement au niveau de la zone à traiter.

Nous avons réalisé l'ensemble des expériences *in vitro* nécessaire à la validation de la preuve de concept. Dans le présent projet nous souhaitons transposer l'étude *in vivo* afin d'appréhender les bénéfices dans le ciblage thérapeutique des tumeurs apportés par une encapsulation dans des gouttes sensibles aux ultrasons d'agents anticancéreux vectorisés. Cette étude sera composée de 2 procédures expérimentales. Dans la première, nous étudierons la cinétique de biodistribution des gouttes dans les souris puis dans la seconde nous étudierons l'efficacité thérapeutique sur des tumeurs implantées dans des souris. Pour mener à bien cette étude nous serons amenés à utiliser 132 souris (96 pour la première procédure et 36 pour la seconde). Comme mentionné plus haut, le vecteur anticancéreux a déjà été évalué sur des animaux. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique (Snedecor et Cochran), 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 (groupe de 3 à 4 souris, nid, jouets etc.) 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 permettront de connaître l'intérêt de l'encapsulation d'agents anticancéreux vectorisés sur leurs capacités thérapeutiques anti-tumorales.

7663 Chez l'homme, la toxine botulique est utilisée dans le traitement de maladies neuromusculaires caractérisées par une contraction permanente d'un groupe de muscles entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux (spasticité des membres, torticolis, contractions de la mâchoire, contraction des paupières entraînant la fermeture répétitive et incontrôlée des paupières...). La contraction musculaire résulte de la stimulation de son nerf associé qui libère un neuromédiateur qui va pénétrer le muscle entraînant sa contraction. La toxine injectée localement empêche la libération de ce médiateur et empêche donc la contraction du muscle. Chez l'homme, le traitement consiste en l'injection de petites quantités de toxine botulique dans les muscles hyperactifs empêchant la stimulation du muscle par le nerf associé permettant un relâchement des muscles hyperactifs injectés. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

Des recherches sont donc faites pour améliorer les propriétés des toxines.

L'activité des toxines est testée selon un processus qui débute par une évaluation *in vitro* (Remplacement). Les tests *in vitro* et *ex vivo* fournissent de nombreux renseignements sur l'activité de la toxine testée mais son effet sur l'activité fonctionnelle du muscle injecté (vitesse d'action, durée, capacités de diffusion) ne peut être appréhendé que dans un système intégré comme l'animal vivant. Le recours aux animaux n'est fait que si les toxines candidates testées *in vitro* répondent aux critères recherchés. Elles seront alors testées *in vivo* sur le rat. Ce projet a pour objectif d'étudier les effets de ces toxines candidates sur la communication électrique entre le nerf et le muscle et sur les propriétés contractiles *in situ* de muscles squelettiques striés au niveau de la patte postérieure. Le muscle étudié pourra être le muscle injecté ou un muscle adjacent, permettant ainsi l'étude de la diffusion des toxines.

Les trois différentes procédures réalisées sur les animaux sont :

- L'injection de la toxine par voie intramusculaire sur animal sous anesthésie gazeuse. Cette injection d'un petit volume est faite à travers la peau ou, si nécessaire, après une petite incision de la peau. L'ouverture est ensuite refermée (agrafe ou suture).

- La mesure électrophysiologique du signal électrique se déroule sur animal sous anesthésie gazeuse et permet de quantifier la conductibilité du signal électrique sur l'axe « nerf-muscle » à l'aide d'aiguilles/électrodes permettant la stimulation du nerf et l'enregistrement du signal. Cette technique est appelée Potentiel d'Action Musculaire et permet une étude cinétique sur les mêmes animaux, limitant ainsi le nombre d'animaux utilisés.

- La mesure fonctionnelle des contractions *in situ* est réalisée sur animal sous anesthésie gazeuse et analgésié. Une électrode est placée au niveau du nerf sciatique pour le stimuler et un capteur est placé sur le tendon du muscle pour mesurer la force induite. Cette procédure est sans réanimation.

Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale gazeuse par inhalation (isoflurane) qui permet un réveil rapide lorsqu'elle est arrêtée. La troisième procédure (Force *in situ*) étant plus invasive que les autres une analgésie préopératoire sera réalisée. Les animaux sont hébergés en groupe durant toute l'étude. Les animaux sont pesés tous les jours pendant une semaine après l'injection de la toxine, puis 2 fois par semaine si l'étude se prolonge permettant ainsi de compléter la surveillance quotidienne de leur état de santé (Raffinement). Des points limites adaptés seront utilisés afin de mettre un terme à l'étude si nécessaire.

Le nombre d'animaux impliqués dans chaque groupe expérimental sera de 10. Ce nombre est basé sur des données bibliographiques et statistiques sur ces modèles et sera réévalué après la phase de mise au point du modèle. Le nombre total d'animaux utilisés dans ce projet sera de 2520 rats sur une période de 5 ans. Ce chiffre est basé sur l'hypothèse d'une phase de validation des techniques utilisées, suivie de la caractérisation de 5 toxines candidates évaluées à 3 doses différentes (non-toxiques) et à 3 temps différents après injection. Un effort de Réduction sera fait en utilisant des groupes contrôles communs (injecté avec le véhicule) et en essayant d'utiliser au maximum les mêmes animaux pour les deux mesures.

7664 L'objectif des protocoles d'immunisations souris est la production d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux, qui sont utilisés à des fins scientifiques et médicales. Les applications pour l'utilisation des anticorps peuvent être diverses comme par exemple :

- Fabrication de tests de diagnostic permettant la détection de maladies en médecine humaine
- Préparation de médicaments pour usage en médecine humaine (médicaments biologiques)
- Applications diverses en recherche et développement

La production d'anticorps sur souris est réalisée par administration d'antigène accompagné ou non d'adjuvant, puis récolte de sang, sérum, plasma ou d'organes des animaux pour envoi pour réaliser la purification et l'extraction des anticorps d'intérêt. Le scientifique justifie par écrit avant chaque procédure de nous sous-traiter des productions d'anticorps ne pouvant être réalisées *in vitro* dans l'état de l'art, ainsi qu'à utiliser le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à la quantité d'anticorps désirée. Les souris sont hébergées en groupes sociaux, avec du matériel de nidification comme enrichissement. Elles sont observées chaque jour par du personnel formé et compétent et des points limites sont mis en place. Le nombre de souris prévu pour ce projet est d'environ 100 par an soit 500 pour toute la durée du projet. Ce nombre correspond à une estimation du besoin annuel basés sur notre expérience des années précédentes.

7665 Le but de ce projet est de déterminer l'effet d'un produit sur le transit gastro-intestinal et sur la constipation chez le rongeur libre de ses mouvements.

Les perturbations du transit gastro-intestinal et la constipation sont des troubles fréquents qui sont provoqués par de nombreux facteurs dont l'alimentation, certains médicaments, des microorganismes, du stress ou des troubles neurologiques. La constipation est une des plaintes au niveau gastro-intestinal les plus fréquentes, avec une forte prévalence et qui affecte la qualité de vie. Cette affection augmente avec l'âge, peut devenir chronique, et peut provoquer une distension abdominale, une obstruction intestinale ou une perforation.

Le transit gastro-intestinal et la constipation impliquent des processus physiologiques très complexes concernant de nombreux paramètres dont le système nerveux autonome et le microbiote. Un modèle *in vitro* ou l'utilisation de cultures de cellules ne sont pas pertinents pour étudier ces systèmes. Le protocole sur l'animal vivant est indispensable pour évaluer les effets de produits modulant ces systèmes physiologiques complexes.

Dans un premier temps, l'effet propre d'un produit sera examiné. Ensuite, son effet sera étudié lors d'une perturbation du transit gastro-intestinal ou de la défécation. Le nombre d'animaux utilisé est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire de 10 animaux par dose étudiée. Le nombre de doses étudiées est de 3 à 5 au plus par produit, et elles sont déterminées en fonction de résultats précédents ou de données de la littérature, pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, soit 50 animaux par produit. Au maximum, 5 produits seront étudiés par an, soit 250 animaux au plus par an, dans 4 procédures différentes, soit 5000 animaux au plus pour la durée maximale du projet. Les animaux utilisés seront des souris (3500 au maximum) ou des rats (1500 au maximum).

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté, un suivi quotidien de leur bien-être et l'application des points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

Le but de ce projet sera de déterminer l'intérêt d'un produit pour réduire et/ou prévenir les perturbations du transit gastro-intestinal et de la constipation.

7666 L'objectif de cette étude est de décrire chez le modèle porcin les conséquences d'un stress psychosocial chronique modéré ou intense au niveau de l'axe intestin-cerveau et des comportements. Cinq groupes expérimentaux seront constitués (au total, 80 porcs conventionnels *Sus scrofa* en croissance, mâles et femelles, de 30 à 60 kg) : groupe d'animaux exposés à un stress psychosocial intense (SC+, N=22 dont 10 animaux surnuméraires pour étude pilote d'imagerie cérébrale) ; groupe d'animaux exposés à un stress psychosocial modéré (SC-, N=12) ; groupe d'animaux exposés à un stress psychosocial intense et traités à la fluoxétine – Prozac 60 mg/animal/jour (SF+, N=12) ; groupe d'animaux exposés à un stress psychosocial modéré et traités à la fluoxétine – Prozac 60 mg/animal/jour (SF-, N=12) ; groupe d'animaux non stressés (NSC, N=22 dont 10 animaux surnuméraires pour étude pilote d'imagerie cérébrale). Les animaux NSC seront hébergés par deux en loges doubles (4,50 m², 1,70 m x 2,65 m) garnies de paille et équipées d'enrichissements de milieu

tels que ballons et autres jouets. Les animaux stressés de manière intense (SC+, SF+) ou modérée (SC-, SF-) seront hébergés en loges individuelles (2,25 m², 0,85 m × 2,65 m) sans paille ni enrichissement de milieu. Seuls les animaux exposés à un stress intense (SC+ et SF+) seront exposés quotidiennement à des bruits stressants et lumières (gyrophare) diffusés de manière aléatoire, ainsi qu'à une distribution des repas à des horaires variables. Après 1 semaine de traitement, 12 animaux par groupe se verront implanter une capsule de mesure de la température corporelle sous anesthésie générale légère (kétamine, 5 mg/kg) et analgésie locale (xylocaïne). Après 4 semaines de traitement, ces mêmes 12 animaux par groupe seront soumis à des tests comportementaux permettant d'étudier la réactivité comportementale face à des situations de stress aigu et/ou de nouveauté : test d'openfield pendant 10 min suivi d'un test de Novelty-Suppressed Feeding pendant 10 min en semaine 5, puis test de contention physique en statif de Pavlov pendant 10 min en semaine 6. Trois phases de prélèvements biologiques (sang et salive) seront réalisées sur ces 12 animaux par groupe : avant la mise en lots, après 4 semaines de traitement, et au moment du dernier test comportemental. Les 10 animaux surnuméraires dans chacun des deux groupes extrêmes SC+ et NSC seront quant à eux uniquement soumis à une session d'imagerie cérébrale par IRMf (imagerie par résonance magnétique fonctionnelle) permettant de cartographier les zones cérébrales modulées par la perception de différents additifs alimentaires potentiellement anxiolytiques / antidépresseurs et stimulateurs de l'appétit. Durant l'imagerie, les animaux seront maintenus à un niveau léger d'anesthésie générale sous isoflurane de façon à prévenir tout mouvement, et placés sous respirateur mécanique et monitoring permanent jusqu'au réveil. Toute cette étude a été conçue de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. REMPLACER : dans cette étude portant sur les effets d'un stress psychosocial, il est impératif d'utiliser des animaux vivants et vigiles pour explorer leur comportement et les réponses de l'axe intestin-cerveau. REDUIRE : pour les données physiologiques, comportementales et d'imagerie récoltées au cours de cette étude, 10-12 animaux par groupe représentent un effectif minimum et raisonnable pour obtenir des différences significatives entre les différents traitements. Cela permettra une analyse par ANOVA multifactorielle. RAFFINER : tous les groupes contrôles (négatif et positif) nécessaires à l'interprétation des résultats ont été envisagés et notamment le traitement de référence de la dépression (Prozac). Les procédures d'implantation de la capsule de mesure de la température sous-cutanée, d'anesthésie lors de l'imagerie cérébrale, et d'euthanasie ont été conçues et validées par un vétérinaire.

7667 Les *Nocardia* sont des bactéries pathogènes opportunistes saprophytes du sol et des végétaux en décomposition. Ubiquitaires, elles sont aussi retrouvées dans les eaux douces ou salées et dans les poussières atmosphériques, et plus récemment pour la première fois en France dans un bassin d'infiltration de la région lyonnaise. On retrouve donc les *Nocardia* à la fois dans l'environnement et dans certaines maladies appelées Nocardioses.

Dès lors la question qui se pose est de savoir si les souches de *Nocardia* issues de l'environnement ont le même pouvoir pathogène que les souches cliniques que l'on retrouve chez les patients. La Nocardiose est une maladie rare mais grave qui atteint préférentiellement les patients immunodéprimés. Cependant l'observation de cas en l'absence apparente de facteurs prédisposant n'est pas exceptionnelle. Les Nocardioses peuvent se présenter sous forme de symptômes cutanés, pulmonaires ou nerveux. En particulier les symptômes nerveux sont souvent associés à des signes de maladie de Parkinson chez l'homme. Des équipes de chercheurs américains ont décrits pour la première fois un modèle de souris présentant des symptômes similaires à la maladie de Parkinson suite à l'injection d'une dose non mortelle d'une souche clinique de *Nocardia* (GUH2). Ils ont pu tester la virulence de la souche, déterminer les doses mortelles (létales DL50) et établir une différenciation du pouvoir pathogène en fonction du stade de croissance. Les relations entre les formes cérébrales de nocardiose et la maladie de Parkinson font l'objet de nombreuses recherches mais à ce jour aucun lien direct n'a encore clairement été établi entre l'infection et le déclenchement de la maladie. Le but de ce travail est de tester le pouvoir pathogène des souches retrouvés dans l'environnement et de les comparer à la souche clinique connue GUH2 afin de connaître le risque sanitaire de la présence de ces souches dans l'environnement et dans les bassins d'infiltrations. Ces études de virulence seront étudiées chez la souris car aucun modèle *in vitro* ne peut refléter les symptômes de la maladie de Parkinson ce qui nous oblige à travailler sur un modèle animal. Par ailleurs, le travail sur un organisme vivant nous permettra de mieux comprendre quels sont les organes que les bactéries peuvent

coloniser et où elles peuvent exercer leur pouvoir pathogène. Afin de limiter le nombre d'animaux et de choisir la souche et les doses de bactérie optimales des tests de génomique comparative, de résistance à différents antibiotiques et des tests phénotypiques ont été réalisés préalablement *in vitro*. L'ensemble des données obtenues seront comparées avec celles de la souche clinique GUH2. Les animaux seront suivis quotidiennement afin d'identifier s'ils développent ou pas des signes de maladie de Parkinson selon une grille. La maladie de Parkinson peut être douloureuse chez certains patients (environ 2/3 des patients chez l'homme) mais aucune donnée, liée à cette maladie, n'existe sur la douleur chez l'animal. Les animaux qui présenteraient des signes caractéristiques de la maladie de Parkinson (tremblements, troubles de la locomotion, etc.) seront suivis et traités systématiquement par des médicaments antidouleur. Au cours des 6 prochains mois, une expérimentation sera réalisée avec un petit groupe de 42 souris avec une seule dose de bactérie. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'étude et des prélèvements biologiques permettront d'évaluer également la dissémination des bactéries dans l'organisme ainsi que les lésions éventuelles que ces bactéries auraient pu provoquer. En connaissant le pouvoir pathogène des *Nocardia* présentes dans notre environnement, notre étude permettra de mieux cerner le risque de la présence de telles bactéries et de prendre des mesures afin de protéger les populations exposées à ce risque.

7668 Le fer joue un rôle clé dans diverses voies physiologiques. Le métabolisme du fer dans le muscle squelettique est important pour la production de l'énergie (ATP) et donc essentiel pour la performance physique. L'hepcidine est le régulateur principal de l'homéostasie systémique du fer. Chez les athlètes, le niveau d'hepcidine semble être augmenté. La mutation du gène HFE provoque une hémochromatose héréditaire avec un trouble de surcharge en fer et un faible niveau d'hepcidine. Récemment une étude a démontré que les sportifs qui accèdent aux podiums internationaux présentent une fréquence importante de mutation hétérozygote pour le gène HFE (80%).

Les mutations du gène HFE sont parmi les plus fréquentes dans les populations originaires d'Europe du Nord avec une prévalence de 1 sur 300. De nombreuses études ont démontré l'importance de l'homéostasie du fer et les conséquences délétères de son dérèglement. L'hémochromatose se caractérise par une hyper absorption du fer par l'intestin, entraînant une surcharge en fer majoritairement au niveau du foie. L'hémochromatose est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible les conséquences de cette mutation, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans la biodisponibilité du fer au cours de l'hémochromatose. En premier lieu, nous étudierons l'impact de la biodisponibilité du fer chez la souris jeune adulte à l'exercice et à l'entraînement en endurance en utilisant des souris génétiquement modifiées. L'évaluation de la performance et des paramètres métaboliques des souris sera effectuée grâce à des tapis roulants couplés à des analyseurs de gaz. Ainsi, le concept de nos plateformes techniques est de mener des expériences non-invasives sur les souris afin de pouvoir continuer à utiliser ces souris pour pouvoir étudier les effets de l'entraînement sur le long terme. Le nombre de souris utilisées sera de 48. Dans un second temps, si nous trouvons un effet significatif de l'entraînement sur la performance, nous appliquerons ce protocole à des souris adultes de 12 mois et âgées (24 mois). Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 240.

Pour respecter le principe des 3R, nous nous servirons de nos premiers résultats afin d'optimiser et de réduire le nombre d'animaux nécessaires pour chaque groupe. Nous souhaitons mettre en place et utiliser des moyens d'études non-invasifs, peu ou pas douloureux, ce qui permet de laisser les animaux en vie, et d'augmenter ainsi la puissance de l'analyse statistique grâce à l'utilisation du même animal sur la durée (notion de mesure répétée).

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, un enrichissement des cages sera mis en place et les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Cette série d'études chez la souris permettra d'avaliser les précédentes études sur le gène HFE et les performances de haut niveau. A notre connaissance, il n'y a pas d'étude publiée qui cherche à établir une relation mécanistique de cause à effet entre la fréquence des mutations et la performance physique. Les objectifs de ce projet sont donc d'identifier l'impact de la biodisponibilité du fer chez la

souris à l'exercice et à l'entraînement en endurance afin de comprendre l'influence de la mutation du gène HFE chez l'Homme.

7669 Ce projet a pour but de comprendre les mécanismes cellulaires sous-jacents à une reconstruction de la voie nigro-striée dans le cadre de thérapies cellulaires pour le traitement de la maladie de Parkinson.

La maladie de Parkinson est une maladie du cerveau qui se traduit par des troubles moteurs dus à la mort progressive et accélérée de cellules appelées neurones dopaminergiques dans une région précise du cerveau : la substance noire. Ces neurones localisés dans la substance noire envoient des projections vers le striatum (autre région du cerveau spécialisée dans la fonction motrice).

Une des approches thérapeutiques expérimentales de la maladie de Parkinson consiste à greffer des neurones fœtaux dopaminergiques dans la substance noire. Chez les patients parkinsoniens, des essais cliniques de transplantation de neuroblastes provenant de fœtus humains ont abouti à certaines améliorations motrices, mais n'ont pas encore atteint un niveau justifiant leur utilisation en routine. C'est pourquoi il est nécessaire d'améliorer ces techniques de transplantation cellulaire dans des modèles animaux de la maladie.

Notre équipe a montré que dans des modèles animaux de la maladie de Parkinson, des neurones fœtaux greffés dans la substance noire sont capables de réparer la dégénérescence sur les plans anatomique et fonctionnel. En effet, les axones des neurones greffés dans la substance noire sont capables de traverser plusieurs structures cérébrales et de se connecter sur leurs cellules cibles de manière appropriée dans le striatum. Ceci suggère un guidage directionnel des axones vers cette structure.

Il est dès lors essentiel de comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents à ce guidage. Pour cela nous avons récemment montré que l'expression de la Sémaphorine 7A, molécule de guidage axonal connue pour être impliquée dans l'établissement de la voie nigro-striée pendant le développement, varie de manière significative pendant la reconstruction de la voie par les cellules fœtales greffées dans ce modèle animal de la maladie de Parkinson.

Ainsi, afin de déterminer le rôle de cette molécule dans la reconstruction de la voie nigro-striée, nous testerons l'efficacité de la thérapie cellulaire dans un modèle animal de la maladie de Parkinson déficient en Sémaphorine7A. Le projet se décline en 3 parties :

1. Production du modèle animal de la maladie de Parkinson par induction de la pathologie chez la souris sauvage ou déficiente pour la molécule Sémaphorine7A
2. Transplantation de neurones dopaminergiques fœtaux dans la substance noire de modèles animaux de la maladie de Parkinson déficients ou non pour la Sémaphorine7A.
3. Comparaison du développement et de l'intégration des neurones transplantés sur le plan anatomique et fonctionnel dans les souris déficientes ou non en Sémaphorine7A.

Plus précisément, 6 lots d'animaux seront utilisés :

-3 lots de souris lésées mais non transplantées (1 lot sauvage, 1 lot hétérozygote et 1 lot homozygote), utilisés pour vérifier l'efficacité de la greffe

-3 lots de souris lésées et transplantées (1 lot sauvage, 1 lot hétérozygote et 1 lot homozygote)

Chaque lot comprend 16 souris, un protocole complet nécessite donc l'utilisation de 96 animaux. La règle des 3R a été prise en considération. Nous avons réduit au maximum le nombre d'animaux nécessaires en expérimentation tout en s'assurant d'en avoir le nombre suffisant pour avoir une étude interprétable sur le plan statistique. De nos jours, il n'est pas encore possible de modéliser un cerveau de mammifère *in vitro*, qui nous permettrait d'étudier la transplantation et donc de remplacer cette étude par des expériences *in vitro*. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation qui sont optimisées (sédation et analgésie pour toute manipulation douloureuse ou stressante) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales.

7670 Une inflammation est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression externe comme une infection, un trauma, une brûlure ou une allergie. Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir principalement les globules blancs et des protéines circulantes, comme des anticorps par exemple. Outre les globules blancs, les plaquettes sanguines dont le rôle est avant tout d'assurer l'arrêt du saignement en cas de rupture d'un vaisseau, pourraient également jouer un rôle lors d'une inflammation. En effet, des travaux récents menés chez la souris, suggèrent que les plaquettes sanguines auraient un rôle prépondérant et bénéfique dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation. Ce rôle serait dû à deux récepteurs présents sur les plaquettes, à savoir les protéines GPVI et CLEC-2, appartenant toutes les deux à la famille des récepteurs ITAM. Il existe un troisième membre de cette famille présent sur les plaquettes, mais uniquement d'origine humaine, le récepteur FcγRIIa, encore appelé CD32A, qui est un récepteur pour les anticorps IgG. En particulier, les plaquettes sanguines des souris n'expriment pas de récepteurs aux immunoglobulines. Or, la stimulation de ce récepteur entraîne une activation forte des plaquettes humaines, ou des souris transgéniques pour ce récepteur. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris intervient lui aussi dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation.

Les mécanismes cellulaires participant au développement de l'inflammation sont complexes, aussi leur compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires *in vitro* et, *in vivo* dans des modèles animaux. Ainsi, le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation, a été mis en évidence chez la souris, à l'aide d'un modèle expérimental de réaction inflammatoire d'hypersensibilité, encore appelé modèle d'Arthus. Il s'agit d'une réaction inflammatoire locale cutanée qui s'observe lors de l'injection intradermique d'un antigène à un animal qui possède déjà des anticorps précipitants pour cet antigène. Nous étudierons le rôle du CD32A dans la réaction inflammatoire d'Arthus, à l'aide de souris transgéniques « humanisées », c'est-à-dire exprimant la protéine CD32A d'origine humaine. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires.

Limitation du nombre d'animaux :

Le nombre d'animaux utilisé lors de cette étude est réduit au minimum, ce nombre étant fixé à 6 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs par l'utilisation de test statistique one-way ou two-way ANOVA, selon les questions posées et les expériences.

Raffiner :

Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ; les animaux sont hébergés dans des cages (3 souris/cage) individuellement ventilées contenant un nid en coton compressé et de la frisure de papier Krafft afin de leur permettre d'exprimer leur comportement de nidification naturel et de d'organiser leur environnement;
- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;
- Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel expérimenté.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules.

Cette étude nécessitera au maximum l'utilisation de 158 souris.

7671 Chez les sujets en bonne santé, les périodes de récupération consécutives à des traumatismes ou des maladies nécessitent souvent une période d'immobilisation locale (plâtrage) ou générale (alitement). Les adaptations métaboliques du muscle consécutives à l'inactivité physique conduisent à une perte de protéines musculaires rapide ayant pour conséquences une perte d'autonomie, des retards de récupération, et à terme des coûts de prise en charge élevés. Préserver la masse musculaire lors de ces périodes d'inactivité physique et améliorer la récupération musculaire sont donc un enjeu majeur de santé publique.

L'objectif général du programme de recherche est de développer des stratégies d'intervention préventive, mais également thérapeutique, pour lutter contre les pertes de protéines musculaires. Lors de l'inactivité physique, des altérations mitochondriales sont observées dans les muscles, avec pour conséquences potentielles des altérations de la production d'énergie indispensable à de nombreux processus biologiques. Ces aspects n'ont été très peu voire pas caractérisés pendant les périodes de récupérations.

Nous focalisons le projet sur la mise en place de stratégies d'intervention préventives d'ordre nutritionnel pour préserver l'homéostasie mitochondriale et la masse musculaire :

1) Sur la base de travaux antérieurs, l'utilisation d'un régime enrichi en acide docosahexaénoïque (DHA) en amont de la période d'immobilisation est une approche intéressante pour améliorer la mobilisation des ressources énergétiques intramusculaires,

2) Une activation à bas bruit de la réponse intégrée au stress (ISR) en amont de la période d'immobilisation par l'utilisation alternée de régimes carencés en un acide aminé indispensable (AAI) peut optimiser le renouvellement des mitochondries et la réponse adaptative musculaire.

Cependant les événements de la vie étant loin d'être tous prévisibles, il est également nécessaire de développer des stratégies pour préserver la masse musculaire une fois la situation catabolique déclarée. L'ISR peut promouvoir une réponse adaptative efficace des cellules au stress mais sa suractivation peut aussi avoir des effets délétères sur le muscle.

3) Limiter l'activation de l'ISR par l'utilisation d'un inhibiteur est également une stratégie thérapeutique d'intérêt une fois la situation catabolique déclarée pour préserver la masse musculaire et sa capacité de récupération suite à l'immobilisation.

Le poids et la composition corporelle ainsi que la prise alimentaire seront évalués tout au long de l'expérimentation. La fonction musculaire sera évaluée par la mesure de l'activité spontanée des souris, de la masse, de l'aire et du phénotype des fibres musculaires. Ces points constitueront les points critiques pour déterminer l'efficacité des stratégies proposées. Nous évaluerons également les paramètres qui contrôlent la masse et la fonction musculaire, i.e. le métabolisme protéique musculaire, les profils en acides gras circulants et musculaires, les réserves énergétiques intramusculaires, l'activation ou l'inactivation de l'ISR, les paramètres de l'homéostasie mitochondriale.

Pour répondre à ces objectifs, ce programme expérimental prévu sur une période de 5 années a été divisé en 4 tâches :

- Tâche 1 : Adaptation du modèle d'immobilisation chez la souris

-Tâche 2 : Effet de l'utilisation d'un régime enrichi en DHA pendant 1 à 8 semaines avant l'immobilisation sur l'atrophie et la récupération musculaires.

- Tâche 3 : Effet d'une activation de l'ISR avant l'immobilisation sur l'atrophie et la récupération musculaires.

- Tâche 4 : Effet d'une inhibition de l'ISR pendant l'immobilisation sur l'atrophie et la récupération musculaires.

Nous utiliserons un maximum de 1420 souris réparties dans 7 tâches et sous-tâches. Dans tous les protocoles expérimentaux, les animaux seront adaptés à leur environnement en cage individuelle pendant 3 semaines. Pendant l'immobilisation, les rats réduisent d'environ 15% leur prise alimentaire. Nous pourrions déterminer si tel est le cas chez la souris dans la tâche 1. Dans ce cas, des groupes de souris pair-fed des souris immobilisées seront inclus afin de pouvoir comparer les effets de l'immobilisation et/ou de la récupération musculaire indépendamment de modifications de la prise alimentaire. Un certain nombre de critères physiologiques et comportementaux sont définis afin de s'assurer de l'absence de souffrance des animaux pendant le protocole.

Les dispositions prises pour l'application de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE seront les suivantes :

- « Remplacer » les modèles animaux :

Nos questions scientifiques sont centrées sur les effets des différents niveaux de contraintes environnementales sur la physiologie du système musculaires. Les expérimentations animales avec système intégré sont donc primordiales.

Des modifications engendrées au niveau de l'organisme entier, telles que les modifications des sécrétions hormonales par exemple, influencent la cinétique de perte musculaire. De fait, nous nous sommes orientés vers un modèle animal pertinent pour la physiologie musculaire et avons choisi la souris de par l'intérêt des modèles transgéniques disponibles. Il n'existe pas de modèle cellulaire reproduisant nos procédures expérimentales.

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

Pour nos expérimentations, nous avons prévu le nombre nécessaire d'animaux, à la fois pour garder une puissance statistique dans le traitement de nos résultats, et pour palier l'exclusion de certaines souris dans l'expérimentation.

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

Comme développé pour chacun de nos protocoles expérimentaux, nous allons porter une attention particulière au bien-être des animaux. Le suivi quotidien des animaux permet d'identifier des signes de souffrance caractérisés par l'état du pelage, le comportement de la souris (agressivité / apathie), cris, mobilité, alimentation... Le poids corporel et la prise alimentaire seront donc mesurés tous les jours. Dans le cas où un animal présenterait des signes manifestes de souffrance ou perte de poids excessive ($\geq 20\%$ du poids initial), il sera sorti des procédures expérimentales et euthanasié si les signes persistent dans les 24h.

7672 La maladie de Parkinson (MP) se caractérise par une dégénérescence progressive des neurones dopaminergiques localisés dans la substance noire compacte perturbant le fonctionnement d'un ensemble de structures sous corticales constituant les ganglions de la base. La conséquence est, entre autres, l'apparition de la triade classique des symptômes moteurs de la maladie de Parkinson, à savoir rigidité, akinésie et tremblement de repos. Le problème majeur de cette maladie est que ces symptômes moteurs n'apparaissent qu'à partir d'un seuil critique d'environ 60-80 % de dénervation de ces neurones dopaminergique. En d'autre terme, les symptômes moteurs n'apparaissent que très tardivement, lorsque la majorité des neurones dopaminergiques a déjà disparu. Dans un contexte clinique où les traitements disponibles sont uniquement symptomatiques sans permettre de soigner la maladie, et entraînant fréquemment de nombreux effets secondaires, il semble crucial d'identifier des stratégies de détection précoce, avant l'apparition des premiers symptômes moteurs, afin d'intervenir rapidement pour ralentir son évolution et préserver une meilleure qualité de vie pour ces patients sur une plus longue durée.

Les traitements actuels de la MP permettent de bien contrôler les symptômes moteurs pendant un certain temps mais provoquent également des effets secondaires très forts pouvant être plus délétères que les symptômes de la maladie eux-mêmes.

Le développement de nouvelles molécules anti-parkinsoniennes utilisent classiquement des « read-out » de comportements, bien que très efficaces, ils sont parfois insuffisamment sensibles pour détecter le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules en développement. Dans ce projet, nous proposons d'utiliser des read-out fonctionnels en allant enregistrer les perturbations liées à la MP directement dans le cerveau. Pour ce faire nous allons utiliser des techniques d'électro-encéphalographies (EEG). L'EEG est un outil utilisé tant en clinique qu'en étude préclinique et permet un passage de l'un à l'autre assez facilement. Nous nous sommes ainsi basés sur des études cliniques ayant montré des modifications du fonctionnement EEG de certaines structures du cerveau chez des patients atteints de la MP pour étudier ces activités EEG dans un modèle de rat parkinsonien. Des études préliminaires ont ainsi montré des activités EEG pathologiques chez notre modèle de rat parkinsonien similaire à ceux observés chez des patients atteints de la MP. Ces biomarqueurs EEG translationnels vont nous permettre d'évaluer plus efficacement le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules en développement dans des protocoles dit aigues et chroniques.

La maladie de Parkinson est une maladie dite de réseau impliquant différentes structures cérébrales. Il n'existe donc pas d'alternative expérimentale pouvant reproduire la transmission d'information entre différentes structures du cerveau.

Ce projet est composé de 3 procédures expérimentales et requerra l'utilisation de 2400 rats. Ce nombre d'animaux a été déterminé de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant un nombre suffisant pour garantir la validité et fiabilité des expériences qui seront menées.

Les animaux seront observés au moins une fois par jour afin d'identifier tout inconfort, douleur ou détresses. Une échelle de cotation de souffrance basée sur des signes indicatifs de gêne ou de douleur sera utilisée afin d'évaluer l'état général de chaque animal et de définir le point limite, permettant de prendre les dispositions adéquates le plus rapidement possible pour préserver le bien-être de l'animal. Les animaux seront stabulés suivant les critères relatifs aux soins et à l'hébergement des animaux de l'annexe II du premier Février 2013.

Ce projet in fine a pour but d'identifier de façon plus fiable et efficace de nouvelles molécules dans le traitement de la maladie de Parkinson.

7673 Le but de ce projet est de tester des inhibiteurs des NADPH oxydases (NOX) dans un modèle murin de fibrose hépatique. Ces enzymes génèrent des espèces réactives de l'oxygène qui vont avoir un rôle dans des aires thérapeutiques nombreuses et variées en jouant notamment un rôle important dans des mécanismes d'inflammation et de fibrose. Nous souhaitons donc démontrer si nos composés inhibant les NOX sont efficaces sur la fibrose hépatique, la production des ROS dans le foie et l'augmentation des enzymes hépatiques (AST et ALT) induites par un agent toxique dans le foie.

Aucun modèle *in vitro* ou *ex vivo* n'existe pour mimer toutes les composantes d'une fibrose hépatique. Ces modèles ne peuvent pas prédire le comportement biologique *in vivo* d'un composé ou l'impact physiologique et l'efficacité d'un traitement donné. La mise en œuvre de modèles animaux est donc nécessaire à la sélection de nouvelles molécules et au développement de nouvelles thérapies en phase d'évaluation préclinique. Le modèle de Carbone Tétrachloride (CCl₄) induisant une atteinte hépatique et une fibrose chez la souris est un bon modèle pour répondre à cette problématique de sélection de molécules dans cette indication. NOX1 joue un rôle très important pour la protection des hépatocytes vis-à-vis de la mort cellulaire. Des souris KO pour le gène NOX1 et NOX4 ont montré une protection importante dans ce modèle de CCl₄. La question est donc maintenant de démontrer l'effet d'inhibiteurs pharmacologiques dans la protection des foies en conditions d'atteinte chronique. Il est prévu de tester 4 molécules différentes sur la durée du projet, comparées à notre molécule référence pour valider chaque expérience. 10 souris seront incluses par groupe.

L'euthanasie des animaux aura lieu 48 heures après la dernière injection de CCl₄, permettant le prélèvement de sang et de foie pour valider les marqueurs de fibrose et d'atteinte hépatique.

Les animaux seront hébergés dans des conditions standard d'animalerie, par lots de 5 par cage et recevront une alimentation et un abreuvement à volonté. L'environnement des animaux sera enrichi par des cotons afin de constituer des nids et un dôme rouge pour se cacher.

Le nombre de 10 animaux par groupe nous apportera le meilleur compromis entre réduction du nombre d'animaux utilisé et puissance statistique suffisante.

Un total de 240 souris C57BL/6 mâles est demandé pour ce projet portant sur 3 années maximum.

Enfin ce modèle est décrit dans la littérature comme étant robuste, reproductible et très représentatif des cas cliniques chez l'Homme. Les résultats générés et les différents paramètres analysés permettront ainsi d'envisager sereinement une transposition de l'activité attendue chez l'Homme et de pouvoir prouver la valeur réelle des molécules testées.

7674 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de

fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucun ne permet à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 240 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de rat génétiquement modifié pour un gène retrouvé muté chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire afin d'étudier les mécanismes mis en jeu par ces mutations.

7675 Le projet présenté a pour but d'évaluer la performance et la sécurité d'un nouveau dispositif d'autotransfusion lors d'expérimentations non cliniques. Après réalisation d'une chirurgie conduisant à un saignement contrôlé, le sang épanché est collecté et traité par le dispositif puis réinjecté à l'animal. Un suivi clinique et hémato-biochimique de l'animal est réalisé pendant au moins 72 heures.

L'objectif de ce projet est de vérifier et valider la sécurité du traitement du sang et de sa transfusion notamment la performance en montrant la concentration des globules rouges et des plaquettes et en évaluant les effets cliniques après réinjection.

Le nombre total d'animaux prévus sur 5 années est de 50 mini-porcs à raison de 10 porcs par an.

Dans le cadre des 3Rs :

- Remplacement : pour les besoins de développement et de test d'efficacité du dispositif étudié, le remplacement des animaux par des méthodes substitutives n'est pas possible ici (retransfusion de sang à l'animal vivant pour suivre les paramètres biologiques en comparaison à une situation clinique)
- Réduction : le nombre d'animaux est fixé au minimum afin d'obtenir un groupe représentatif (5 à 6 animaux par groupe/essai)
- Raffinement : afin de réduire le stress, les animaux sont hébergés selon les recommandations de la directive européenne. Chaque animal est hébergé dans un box individuel et peut voir et sentir ses congénères au travers d'un grillage. Les animaux reçoivent une ration identique à celle fournie par le fournisseur d'animaux, avec de l'eau à volonté. Des jouets adaptés sont mis à disposition pour chaque animal.

7676 Comprendre les mécanismes de la neurogenèse (c'est-à-dire la fabrication de nouveaux neurones dans le cerveau) est d'une importance capitale pour ouvrir de nouvelles perspectives médicales pour le traitement de nombreuses affections dont les maladies neurodégénératives.

La neurogenèse chez les poissons adultes est bien plus massive que chez les mammifères. Toutes les régions de leurs cerveaux produisent de nouveaux neurones alors que chez les mammifères, seul le cerveau antérieur est doué de cette propriété. Pourtant, notre connaissance des mécanismes de neurogenèse chez les poissons reste très parcellaire. Il a été montré sur la base des quelques

marqueurs moléculaires qu'il existe deux grands types de progéniteurs (les cellules en prolifération à l'origine des nouveaux neurones) dans le cerveau des poissons : des progéniteurs dits gliaux et d'autres dits neuroépithéliaux. De nombreuses études sont menées sur les progéniteurs gliaux car la neurogenèse chez les mammifères s'appuie sur des cellules analogues. Mais, les progéniteurs neuroépithéliaux, qui sont les plus abondants, sont encore peu étudiés.

Notre projet vise à décrire la répartition et le profil moléculaire de ce type de progéniteur.

Pour cela, nous devons établir une lignée transgénique de médaka (un petit poisson tropical très approprié pour la transgénèse) dans laquelle les progéniteurs neuroépithéliaux seront marqués par une protéine fluorescente. L'analyse du patron de fluorescence nous permettra de décrire la répartition de ces progéniteurs dans l'ensemble du cerveau. D'autre part, cette lignée nous permettra de trier les cellules fluorescentes pour documenter ensuite leur profil d'expression des gènes. Nous saurons alors quels processus métaboliques et quelles fonctions cellulaires sont particulièrement importants pour les progéniteurs neuroépithéliaux.

Ce projet nécessitera la création de poissons transgéniques fluorescents. Aucune souffrance particulière n'est à attendre avec ce type de transgène car la protéine fluorescente n'interfère pas avec les fonctions biologiques du poisson. Toutefois, dans un souci de réduction du nombre d'animaux à produire, nous avons préféré le médaka au plus classique poisson-zèbre. En effet la création d'une lignée transgénique de médaka requiert moins d'animaux que la création d'une lignée transgénique chez le poisson-zèbre.

L'analyse de la répartition des cellules fluorescentes impliquera une procédure d'injection (une piqûre) dans l'abdomen. Il s'agit d'une manipulation de routine effectuée sous anesthésie pour laquelle les animaux seront susceptibles de subir un désagrément classé comme léger.

Un maximum de 180 poissons sera utilisé au cours de ce projet.

7677 Objectifs du projet

Notre équipe étudie les bases moléculaires du développement précoce du système nerveux. Spécifiquement nous étudions la survie et la prolifération de précurseurs neuronaux dans le cerveau chez le Xénope, en particulier une voie de signalisation connue pour son rôle dans la promotion de la prolifération des cellules cibles. Comprendre comment la pluripotence et l'auto-renouvellement des cellules souches sont maintenus grâce à cette voie est un enjeu de recherche fondamentale majeur et permettra aussi d'aider à comprendre l'émergence de cancers pédiatriques, dont certains sont issus de la prolifération erratique des cellules souches. L'étude des mécanismes est possible dans des œufs de Xénope fécondés *in vitro*, qui sont analysés ensuite à des stades embryonnaires très précoces.

Avantages et dommages escomptés

L'amphibien *Xenopus laevis* est un organisme modèle pour l'étude des processus développementaux chez les vertébrés. Les études réalisées à partir de ce modèle permettent de mieux comprendre les processus développementaux des modèles mammaliens dont l'homme. L'analyse du génome de *Xenopus* montre d'importantes similitudes avec le génome humain, notamment 79% des gènes identifiés dans des maladies humaines ont leur équivalent chez *Xenopus*. L'utilisation de ce modèle permet d'associer aux approches d'embryologie classique, de biochimie et de biologie cellulaire, des études à large échelle de l'expression des gènes et des analyses pharmacologiques.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Afin d'obtenir les embryons nécessaires à nos expérimentations, nous prévoyons d'utiliser 3 xénopes femelles par semaine. Les animaux utilisés seront ensuite mis au repos durant 4 mois. Ainsi, durant les 5 années du projet, nous anticipons d'utiliser au maximum 50 xénopes femelles sauvages adultes qui seront périodiquement stimulées par injection d'hormone selon les protocoles standard.

Conformité avec les exigences 3R

Le vertébré tétrapode non mammifère *Xenopus laevis* répond idéalement aux recommandations des 3R. Le choix du modèle, et des pratiques expérimentales reposent sur les propriétés suivantes :

- i) Un grand nombre d'embryons (plusieurs milliers) sont obtenus par fécondation *in vitro* à partir d'un nombre limité d'individus adultes et de façon non invasive, permettant à plusieurs expérimentateurs de travailler simultanément,
- ii) Une estimation de la variabilité interindividuelle naturelle (animaux sauvages non sélectionnés) et une analyse statistique immédiate des résultats obtenus. Le développement externe des embryons permet une observation non-invasive.
- iii) De nombreuses expériences peuvent se restreindre aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome.
- iv) L'amphibien *Xenopus laevis* possède une longévité et une période de reproduction remarquables (15 ans) ce qui en fait un excellent modèle pérenne pour les études d'ordre génétique.
- v) Les femelles utilisées dans les expériences impliquant une fécondation *in vitro* peuvent être induites à pondre plusieurs fois en respectant un intervalle de 4 mois entre chaque ponte, minimisant le stress potentiellement engendré.

Toutes ces caractéristiques minimisent significativement le nombre d'animaux nécessaires au projet, sans compromettre ses objectifs scientifiques. Au contraire, notre projet explore des étapes du développement qui ne pourraient pas être abordées aussi efficacement et simplement dans un modèle mammifère.

7678 La formation pratique des chirurgiens (formation initiale et formation continue) se fait suivant plusieurs modalités : formation en qualité d'aide opératoire (compagnonnage) et formations suivies dans des centres de simulation (laboratoires d'anatomie humaine, laboratoires utilisant des simulateurs électroniques, des tissus inertes et des animaux vivants). Désormais, pour des raisons de sécurité, de temps et de coût ainsi qu'à la demande de la Haute Autorité de Santé et selon les Directives Européennes, il est nécessaire qu'une part plus importante de la formation chirurgicale soit faite en dehors du bloc opératoire humain, via la simulation.

Le projet s'adresse plus spécifiquement à la formation des chirurgiens vasculaires. Ils doivent maîtriser les dissections, les sutures vasculaires et connaître les gestes d'urgence en cas de plaies vasculaires ainsi que les techniques de chirurgie endovasculaire avant toute intervention chez le patient. Le projet s'adresse également aux chirurgiens cardio-vasculaires dans l'apprentissage de la mise en place d'une CEC (circulation extra-corporelle) ainsi qu'aux chirurgiens digestifs en formation qui sont chargés de prélever les organes dans le cadre de prélèvements sur donneur en mort cérébrale.

Avant tout apprentissage pratique sur l'animal, tous les apprenants en formation initiale ont suivi une formation obligatoire d'une semaine qui comprend des ateliers sur tissus inertes, organes prélevés, simulateurs électroniques et sujets anatomiques.

Le porc vivant, de par ses nombreuses similitudes anatomiques avec l'homme, est parfaitement adapté pour la formation des techniques de chirurgie vasculaire et endovasculaire. Pour ce qui concerne la chirurgie cardio-vasculaire, l'ovine est l'espèce la plus adaptée pour les opérations cardiaques à cœur ouvert.

L'entraînement sur l'animal vivant est indispensable si on veut recréer des conditions proches de la chirurgie chez l'homme et familiariser les chirurgiens à la dissection sur tissu vivant, très différente de celle sur sujet anatomique, ainsi qu'au contrôle de l'hémorragie. Chaque enseignement pratique est précédé d'un cours théorique et il est suivi d'une évaluation. Tous les animaux du projet subiront une anesthésie générale et une analgésie adaptée et seront euthanasiés par surdosage anesthésique à l'issue de chaque procédure. Afin de limiter le nombre d'animaux tout en donnant des formations de qualité il est prévu pour les procédures de chirurgie vasculaire et cardio-vasculaire 3 apprenants/animal. Par contre pour la procédure sur les prélèvements d'organes il est prévu 2 apprenants maximum/animal afin de bien simuler la situation réelle rencontrée lors des prélèvements chez le donneur en état de mort cérébrale.

Au total, nous avons évalué le nombre d'animaux à 270/5ans (210 porcs charcutiers et 60 ovins). Le nombre d'animaux est dépendant du numérus clausus. Ce nombre peut être moins important s'il y a moins d'apprenants ou si de nouveaux simulateurs électroniques plus performants sont développés.

7679 Le coronavirus de la dinde (TCoV) est avec le coronavirus de la bronchite infectieuse du poulet l'un des deux coronavirus aviaires les plus importants en termes d'impact économique. Depuis plusieurs décennies, de nombreux virus ont été associés à des cas d'infections mixtes nommées « poult enteritis complex » (PEC). En 2008, un coronavirus (Fr-TCoV 080385d) a été isolé à partir de dindonneaux présentant des signes cliniques compatibles avec PEC. Dans des études publiées en 2011, et plus récemment en 2016, l'analyse de la séquence du génome entier de ce virus a démontré l'existence de recombinaisons complexes entre cette souche française, les souches américaines, un coronavirus européen isolé sur la pintade et des souches du virus de la bronchite infectieuse. Des études épidémiologiques moléculaires ont aussi montré qu'à l'image des autres virus à ARN, les coronavirus évoluent rapidement. Les taux de mutation élevés de ces virus peuvent entraîner l'émergence d'une population hétérogène de génomes viraux au niveau d'un individu. En termes d'évolution, cette diversité correspond à un réservoir massif de virus sur lesquels une sélection se fait. Des virus variants avec des capacités améliorées en termes d'infectiosité et de pathogénicité peuvent émerger dans un environnement donné. L'adaptation permanente du virus à son environnement est un problème majeur pour l'émergence virale et particulièrement en cas d'échappement à la réponse immunitaire.

Grâce aux précédents travaux qui ont permis de déterminer à la fois la dose minimale infectieuse, et le taux de reproduction (R0) du coronavirus de la dinde (souche TCoV 080385d/6.3) chez le dindonneau, il est maintenant possible d'effectuer cette étude sur l'évolution de la variabilité génétique de la souche TCoV 080385d/6.3 au fur et à mesure des passages du virus d'oiseau à oiseau. L'évolution de génome viral va être mesurée en analysant le contenu intestinal grâce aux nouvelles technologies de séquençage des génomes (Next Generation Sequencing : NGS).

La procédure expérimentale demandée (reproductible une seconde fois en cas d'échec) fera appel à 30 dindonneaux (soit 60 au total pour le projet) sur une période de 23 jours. Les expérimentations conduites seront faites dans le respect de la règle des 3R. L'effectif retenu correspond au nombre d'animaux minimal permettant la mise en œuvre de test statistique et le suivi de l'évolution du génome viral. L'espèce cible étant la dinde, et du fait qu'il n'existe pas de méthodes alternatives, le projet nécessite le recours à l'expérimentation animale.

En conditions expérimentales, le virus étudié peut provoquer dans de rares cas une entérite (inflammation des muqueuses intestinales) modérée et transitoire, ne s'accompagnant pas de mortalité ou de souffrance importante chez les animaux inoculés (inoculation du virus par voie orale). Du fait de l'absence de symptômes évidents, l'infection des animaux inoculés sera mise en évidence par un test moléculaire sur des prélèvements cloacaux. En début d'expérimentation, une prise de sang sera également réalisée.

7680 Les myopathies congénitales se caractérisent par des anomalies structurelles des fibres musculaires qui entraînent une faiblesse musculaire généralisée. Déficit respiratoire, atrophie musculaire, difficultés à mobiliser les bras et à marcher, la gravité et l'évolution de ces maladies génétiques rares peuvent varier d'une myopathie congénitale à l'autre, voire d'un patient à l'autre. Parmi les formes les plus graves, on compte les myopathies centronucléaires, qui se distinguent par la position centrale des noyaux des fibres musculaires, normalement localisés en périphérie. Ces maladies touchent aujourd'hui une naissance sur 50 000 dans le monde et peuvent déboucher sur une perte de la marche autonome, et parfois sur une incapacité respiratoire associée au décès précoce des patients lors de l'enfance. Elles impliquent des mutations localisées dans gènes codant pour des protéines régulant l'organisation des cellules musculaires. Trois gènes principaux ont pour l'heure été identifiés : la myotubularine (MTM1), la dynamine 2 (DNM2) et l'amphiphysine 2 (BIN1). Selon le cas, la maladie se transmet à la descendance selon un mode autosomique dominant, récessif ou lié au chromosome X. A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif, l'approche thérapeutique étant uniquement symptomatique et multidisciplinaire (kinésithérapie, appareillage...).

Suite à des preuves de concept thérapeutiques faites dans des modèles de souris précédemment, il a été conclu un contrat de collaboration avec une start-up privée pour continuer ces travaux de développements précliniques sur plusieurs modèles de myopathies congénitales. Il a été précédemment montré qu'en diminuant, par croisement génétique, le niveau d'expression de la dynamine 2 chez des souris atteintes de myopathie centronucléaire, elle obtenait leur rétablissement

quasi-total sur l'ensemble des signes cliniques de la maladie, et l'allongement de leur durée de vie. Le but de la start-up est de réaliser *in vivo* des preuves de concept avec des oligonucléotides antisens (ASO) ciblant le gène de la dynamine 2 humaine pour développer une nouvelle approche thérapeutique pour le traitement des myopathies centronucléaires. Pour cela, nous prévoyons d'utiliser un modèle de souris transgénique exprimant la dynamine 2 humaine (hDNM2).

Les modifications génétiques chez les souris nous permettent d'étudier les pathologies humaines chez les souris, et de mieux comprendre leur développement. Les souris seront analysées *in vivo*/ *in situ* / *in vitro* et les tissus seront prélevés pour des expériences *in vitro* ultérieures (REPLACEMENT). Plusieurs procédures expérimentales (maximum une/jour) seront réalisées chez les mêmes souris, pour réduire le nombre total de souris (REDUCTION). 15 souris/groupe seront utilisées pour garantir une bonne puissance statistique, et par là, garantir la validité scientifique de l'étude. Afin de s'assurer que les souris ne souffrent pas, les souris seront surveillées quotidiennement. Tout signe de douleur sera pris en charge en prenant les mesures appropriées en fonction du niveau de douleur observé (soit un analgésique sera administré, soit les animaux seront retirés de l'étude, prématurément si nécessaire) (RAFFINEMENT).

Un maximum de 2520 souris sera utilisé.

7681 Objectif scientifique du projet

En France, le cancer représente la première cause de mortalité. Le sarcome est un type de cancer rare dans lequel plus de 150 sous-types ont été décrits. Cette diversité est sans doute bien plus grande puisqu'environ 10 à 15% des sarcomes sont dit « inclassés » par les pathologistes, c'est-à-dire sans altérations génétiques pathognomoniques. En effet, l'une des caractéristiques des sarcomes est la présence à une fréquence élevée (environ 20%) d'une altération génétique caractéristique telle qu'une translocation chromosomique. Le manque de caractérisation de ses tumeurs pose évidemment un problème pour le diagnostic mais aussi pour la prise en charge des patients.

Il est désormais communément admis que les modèles de xénogreffe dérivés de tumeurs de patients (PDX), sans manipulation *in vitro*, sur des animaux immunodéficients reflètent mieux la biologie tumorale humaine que les tumeurs obtenues à partir de lignées cellulaires. L'établissement de ce type de modèles tumoraux offre par ailleurs la possibilité de représenter la diversité génétique des tumeurs.

Notre groupe de recherche s'intéresse à la caractérisation de ses tumeurs dites « inclassées », grâce au séquençage à haut débit de l'ARN et de l'ADN, à leur biologie et à identifier des cibles thérapeutiques. Nous devons donc explorer fonctionnellement les altérations génomiques identifiés, notamment en établissant des modèles d'études cellulaires et animaux, nous permettant ainsi d'identifier des protéines ou des processus cellulaires actionnables, pour lesquelles des molécules thérapeutiques pourront être testées. La collecte du matériel biologique nécessaire, se fera en collaboration avec des services de chirurgie, de radiologie, de clinique et d'anatomopathologie dans le respect de la réglementation en vigueur à ce jour (consentement éclairé, sérologies, anonymat). Ces tumeurs étant malgré tout rares, il n'est prévu de collecter qu'entre 15 et 30 prélèvements par an.

Une fois la caractérisation histologique et moléculaire établissant la pertinence du modèle par rapport à la tumeur originale effectuée, un effort sera porté sur l'établissement de modèles cellulaires à partir des PDX. Cela permettra d'étudier la réversion de l'altération oncogénique permettant ainsi d'identifier des gènes ou processus cellulaires dépendant de l'oncogène. Les lignées cellulaires établis peuvent également faire l'objet de manipulation génétique visant à moduler l'expression de gènes importants identifiés ci-dessus. L'étude phénotypique de cette modulation *in vitro* pourra conduire -si concluante- à une étude de viabilité et/ou croissance tumorale *in vivo* en réinjectant la lignée modifiée (et la lignée originale en contrôle) dans des souris. Enfin, les modèles seront également utilisés pour identifier des marqueurs soit d'aide au diagnostic soit de réponse aux traitements. Ce projet a donc un potentiel clinique important, avec un transfert vers la clinique, au bénéfice direct des patients, évident.

Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril la production de matériel qui sera nécessaire à l'établissement et la caractérisation des modèles. Une définition précise des points limites, l'administration d'analgésique en pré et post-opératoire et une surveillance adaptée

des animaux permettent de limiter au maximum la souffrance animale. Le nombre estimé de souris pour ce projet est de 920 sur une durée de 5 ans.

7682 La communauté scientifique utilise depuis de nombreuses années les modèles rongeurs pour leurs études dans différents domaines.

La transgénèse, c'est la modification d'un ou plusieurs gène(s) au sein du génome afin d'en étudier le fonctionnement et les interactions.

Dans ce domaine encore, les modèles de préférences sont les rats et les souris.

Les rongeurs sont de très bons modèles expérimentaux puisque ce sont des petits mammifères à reproduction rapide et car ils possèdent 99% d'identité des gènes avec les Hommes.

A l'heure actuelle des connaissances, nous ne pouvons pas nous passer du recours aux animaux pour ces études en raison du caractère complexe d'un individu. Ces lignées transgéniques de rongeurs peuvent devenir des modèles de maladie humaine et vont permettre de mieux comprendre le processus de développement des maladies humaines. Ces modèles peuvent également répondre à d'autres intérêts scientifiques tout aussi importants (comme par exemple devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale). Ces rats et souris, en tant que modèle de maladies humaines, vont également permettre de tester des médicaments et de valider (ou d'invalider) des cibles thérapeutiques. Une fois qu'une lignée est créée, elle est souvent très importante et il faut la maintenir à tout prix pour faire perdurer les études.

Notre objectif ici est de maîtriser et valider deux techniques de prélèvement de sperme *in vivo* sur deux espèces de laboratoire, à savoir : les rats et les souris.

Ce protocole ne sera utilisé que de manière exceptionnelle afin de pouvoir « sauver une lignée » si son maintien sous forme respirante s'avère difficile. Le sperme fertile ainsi collecté, dans la queue de l'épididyme, permettra de réaliser une FIV (Fécondation *in vitro*) ou une insémination artificielle.

Cette saisine concerne uniquement la partie prélèvement de sperme fertile et ne couvre pas les techniques de reproduction assistées. La procédure de collecte s'effectue soit par microchirurgie, soit par ponction transdermique dans la queue de l'épididyme.

La réduction du nombre d'animaux utilisés et leur bien-être est une préoccupation permanente. Ainsi, l'entraînement à la maîtrise de ces techniques, sur les deux modèles, sera fait sur animaux fraîchement euthanasiés. Il n'y aura donc pas d'animaux spécifiquement dédiés pour cette étude (les mâles seront récupérés à la fin d'autres protocoles divers). Lorsque nous serons en capacité de prélever une goutte de sperme fertile sur ces animaux tests, nous pourrons pratiquer ces techniques non invasives sur les animaux vivants ou lignées à « sauver ». Et dans ce cas-là, les rats seront endormis par anesthésie gazeuse (Isoflurane) et les souris par anesthésie fixe (Kétamine/Xylazine). La couverture analgésique (durant et après la ponction) sera adaptée à ce type de procédure (anti-inflammatoire pour les souris et anti-inflammatoire et analgésique chez les rats). Les mâles seront ensuite gardés sous surveillance afin de détecter tout signe d'inconfort et adapter le traitement avec le vétérinaire de l'institut. De l'enrichissement (bois à ronger et nids) est proposé dans les cages. L'amélioration progressive des techniques permet sans cesse de répondre aux exigences de réduction et de raffinement. L'avantage de ces deux techniques de prélèvement, c'est que nous n'avons pas besoin de sacrifier l'animal et qu'il reste fertile après cette intervention, augmentant les chances de maintenir la lignée ou le fondateur d'intérêt.

Notre établissement pense réaliser une dizaine de projet par an et par modèle, soit environ 50 rats et 50 souris sur 5 ans. Ce qui fera 100 animaux au total.

7683 Notre laboratoire étudie le lien étroit entre la signalisation cellulaire et le métabolisme particulier des cellules cancéreuses. Récemment, nous avons identifié un phénotype de mort cellulaire particulier que nous avons appelé glutamoptose. Cette glutamoptose est induite par l'activation de la glutaminolyse, une voie métabolique qui dégrade un acide aminé majeur la glutamine. En effet, notre projet vise à confirmer notre théorie que certaines chimiothérapies inhibent ce processus de mort cellulaire et permet la survie des cellules tumorales. Il n'existe pas *in vitro* un système biologique qui reproduise les conditions cliniques d'utilisation de ces. La complexité et l'hétérogénéité des tumeurs

colorectales que nous étudions ne peuvent pas être appréhendées uniquement que par une approche *in vitro*. Ces modèles de souris sont donc essentiels pour nos recherches sur le lien entre le métabolisme et la signalisation cellulaire particulière de ces tumeurs. Afin de mener à bien cette étude, nous demandons 180 souris pour réduire au maximum le nombre d'animaux en utilisant des modèles statistiques appropriés et en suivant de manière longitudinale la croissance des tumeurs par une mesure non-invasive. Le bien-être des animaux sera suivi par l'équipe de l'animalerie A2 en coordination avec l'équipe de recherche quotidiennement de la naissance à la mort de la souris ce qui permet de limiter au maximum la souffrance de l'animal en réagissant au plus vite.

7684 Le développement de certains composés pharmaceutiques requiert des explorations approfondies réalisées sur l'animal anesthésié (rongeur et/ou non-rongeur). Ces études peuvent être exigées par les autorités réglementaires pour mettre en évidence les propriétés pharmacologiques et ou toxicologiques d'un candidat médicament. Le modèle de l'animal anesthésié offre la possibilité d'exposer les animaux à des doses importantes de candidat médicament, difficilement atteignable chez l'animal conscient, sans souffrance ni douleur et sans interférence avec les effets secondaires habituellement observés chez l'animal conscient tels les vomissements et/ou les effets respiratoires. Ces études peuvent servir à affiner les expériences en amont des études réglementaires qui devront être réalisées par la suite, en permettant de définir les doses efficaces ou toxiques et limiter ainsi le nombre global d'animaux utilisés ultérieurement dans le cadre du développement d'un candidat médicament.

Ce projet consiste en l'administration d'un candidat médicament (produit pharmaceutique chimique ou biologique), chez l'animal sous anesthésie profonde (rongeur, lagomorphe ou non-rongeur : chien ou mini-porc) afin d'évaluer une ou plusieurs fonctions physiologiques et l'impact de ce composé sur la fonction ou le paramètre étudié. Une administration répétée (doses croissantes) est le plus souvent adoptée pour ce type d'études. La voie d'administration est, le plus souvent, la voie intraveineuse. Cependant, il existe d'autres modes d'administration : sous-cutanée, intramusculaire, dermale, intradermique, intra-articulaire, intra-vésicale, intra-vaginale, rectale, intra-péritonéale, intra-gastrique ou duodénale, ou toute autre voie mimant la voie thérapeutique. La durée de la procédure est de quelques minutes à plusieurs heures sur une journée. A la fin de la procédure, les animaux ne sont pas réveillés, mais sacrifiés. Du fait de la complexité que représentent un organisme vivant et les interactions des différentes fonctions physiologiques qui le compose, il n'existe aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* pouvant remplacer en totalité cette évaluation de fonction physiologique chez l'animal entier.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le cadre de ce projet est très variable selon le protocole expérimental mis en œuvre. Il est déterminé, à minima, dans le but d'obtenir des résultats biologiquement et statistiquement représentatifs d'une espèce donnée. Cela permettra d'atteindre tous les objectifs de l'étude d'intérêt tout en limitant, au maximum, le nombre d'animaux impliqué.

Les animaux utilisés sont le plus souvent des animaux issus d'un précédent projet. Dans certains cas le recours à l'utilisation des animaux n'ayant jamais été utilisés dans un autre projet est nécessaire afin d'éviter toute interaction avec un précédent traitement.

Dans le cadre des deux procédures, le nombre total d'animaux nécessaire sur une période de 3 années est estimé à 597 animaux répartis de la façon suivante :

- Souris : 150
- Rats : 150
- Hamster : 45
- Cobaye : 150
- Lapin : 60
- Chien : 21
- Mini-porc : 21

L'état clinique des animaux est vérifié à intervalle régulier tout au long de la procédure et par un monitoring continu de certaines fonctions physiologiques (respiratoires ou cardiaques). Un vétérinaire

est en mesure d'intervenir à tout moment pour évaluer l'état des animaux durant la procédure expérimentale.

L'utilisation des rongeurs est systématiquement favorisée par rapport aux autres espèces.

7685 Aujourd'hui nous faisons face à une véritable pandémie des maladies métaboliques telles que le diabète type 2 et l'obésité. Une étude a quantifié cette pandémie en prévoyant pour 2030 un taux de développement de 72% pour les Etats Unis et même supérieur à 150% pour les pays en cours de développement l'Asie et l'Afrique. Les impacts des facteurs génétiques et les mauvaises habitudes alimentaires (régimes riches en graisse et pauvres en fibre) n'expliquent que 10% de cette pandémie. Dans le but de comprendre ce qui la favorise, un nouvel acteur du contrôle du métabolisme a été identifié, c'est le microbiote intestinal, l'ensemble des microorganismes de l'intestin. Des altérations du microbiote ont été associées à la survenue de pathologies métaboliques, sans encore en avoir identifié tous les mécanismes moléculaires responsables. De plus, il a été récemment montré qu'un régime diabétogène/obésogène induit des altérations du microbiote intestinal favorisant les infections des espèces bactériennes qui colonisent l'intestin dès les premières heures après la naissance. Ces souches transmises par la mère sont des bactéries qui ne posent pas de problème pour l'individu. Cependant, certaines souches sont aussi pathogènes, responsables de diarrhées, méningites, septicémies ou encore infections urinaires, puisqu'elles produisent des toxines. On retrouve aussi des souches commensales exprimant cette gènes toxine dans 25% de la population générale, et une souche probiotique avec des effets bénéfiques pour la santé. Il a été aussi montré que les infections bactériennes peuvent déclencher et aggraver les maladies métaboliques, en agissant par exemple sur des tissus clés comme le tissu adipeux.

Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes moléculaires à travers lesquels certaines souches bactériennes modulent l'homéostasie glucidique ainsi que le microbiote intestinal, dans le cadre des pathologies métaboliques telles que le diabète de type 2 et l'obésité.

Pour réaliser ce projet nous utiliserons deux modèles animaux de souris invalidées pour des molécules qui jouent un rôle clé dans la relation hôte-microbiote. Nous réaliserons des tests clés du métabolisme glucidique. Nous étudierons les organes clés de ce même métabolisme comme le foie, le tissu adipeux et le muscle squelettique. Les souris seront soumises à un régime riche en graisse, afin de permettre la mise en place des pathologies métaboliques observées chez l'homme comme diabète type 2 et obésité. Nous comptons utiliser entre 640-800 souris, soit 8-10 souris par procédure expérimentale (et 4 souches bactériennes plus le contrôle négatif (PBS) pour un total de 5 traitements), sauvages et génétiquement modifiées, de fond génétique C57BL/6J âgées de 5-6 semaines au moment du début du projet, selon le schéma détaillé ci-dessous, valable pour chacune des souches de bactéries à étudier :

Souris génétiquement modifiées au niveau hépatique :

8-10 souris contrôles et 8-10 souris invalidées sous régime normal et non colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime normal et colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime gras et non colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime gras et colonisées par les bactéries.

Souris génétiquement modifiées au niveau intestinal :

8-10 souris contrôles et 8-10 souris invalidées sous régime normal et non colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime normal et colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime gras et non colonisées par les bactéries ; 8-10 souris contrôles et 8-10 invalidées sous régime gras et colonisées par les bactéries.

Avoir 8-10 souris par groupe nous permettra d'atteindre un seuil statistiquement valable et donc de pouvoir interpréter les résultats obtenus en fonction de tests (test t de Student ou ANOVA). Cela permettra donc de ne pas répéter les expérimentations tout en respectant la réduction du nombre d'animaux employés (règle des 3 R). Nous envisageons d'utiliser des souris mâles, dont la littérature montre une vaste gamme des données du microbiote intestinal et de ses altérations. Les animaux seront observés quotidiennement par du personnel compétent et selon la directive européenne 2010/63/UE.

7686 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) se caractérisent par une inflammation du tractus gastro-intestinal. Il existe deux pathologies : la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique. Ces pathologies touchent entre cinq et six personnes sur 100 000. Elles débutent généralement chez le jeune adulte et touchent indifféremment les deux sexes. Elles évoluent par phases de poussées caractérisées par différents symptômes : des diarrhées chroniques, hémorragiques ou non, d'importantes douleurs abdominales et des pertes de poids dues à une mauvaise absorption des nutriments. Ces poussées sont entrecoupées de phases de remissions. Ces pathologies chroniques engendrent un inconfort de vie. Les traitements disponibles aujourd'hui sont soit des traitements symptomatiques, soit reposant sur des actes chirurgicaux. L'étiologie des MICI est encore mal connue.

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

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

5 modèles seront développés :

- le modèle induit par l'administration intracolique d'acide trinitrobenzène sulfonique (TNBS), chez le rat et la souris (aigu et chronique)
- le modèle induit oralement par le sulfate de sodium dextran (DSS), chez la souris (aigu et chronique)
- le modèle induit par l'oxazolone, chez la souris (aigu)
- le modèle spontanée chez les souris dont le gène de l'IL10 est invalidé
- le modèle induit par le transfert de lymphocytes CD45 rhight à des souris immunodéprimées

Afin de répondre à cet objectif le nombre d'animaux utilisés sera de 3600 rats et 12672 souris en raison de 12 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester. Le détail du nombre d'animaux sera présenté pour chaque procédure.

Dès l'induction de la pathologie, les animaux seront suivis régulièrement au cours du temps (de 7 jours et jusqu'à 6 semaines selon le modèle) par des techniques non-invasives : suivi du poids, consistance des fèces et présence de sang dans les fèces évaluées par le test Hémocult II®. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude, permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. De plus, afin de suivre la directive européenne 2010/63/UE, un enrichissement sera rajouté aux animaux. A savoir, pour les souris, dans un premier temps, des carrés de coton pur (type « nestlets ») permettant aux animaux de faire une nidation. Selon la durée de l'étude, un deuxième enrichissement pourra être introduit dans l'environnement, tel que des « aspen Bricks », des tunnels en polycarbonate ou des igloos. Pour les rats, l'enrichissement sera des Aspen brick moyen (enrichissement en bois de tremble), Play tunnel grand ou des refuges en polycarbonate. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé tous les jours.

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

7687 Le choc cardiogénique (CC) se définit comme l'incapacité du cœur à assurer un débit permettant une perfusion suffisante des organes (comme les rein, foie, cerveau). Il se présente sous différentes formes pouvant aller d'un bas débit cardiaque, à un tableau de choc profond avec défaillances d'organes multiples secondaire. L'infarctus du myocarde et ses complications représentent les principales étiologies du CC dans environ 70-80% des cas. Ces CC sont fréquents et touchent 5 à 15% des infarctus en voie de constitution, soit environ 60 à 70000 patients/an en Europe. Malgré les

avancées thérapeutiques réalisées ces dernières années et malgré une surveillance étroite en milieu spécialisé, le pronostic du CC reste effroyable avec une mortalité immédiate de l'ordre de 40 à 50%. Le traitement actuel associe une prise en charge classique de réanimation visant à restaurer une pression artérielle et un débit cardiaque satisfaisants et à l'utilisation de traitements stimulant le cœur ou améliorant la pression artérielle. Cependant, malgré une utilisation quasi-systématique de ces traitements, leur intérêt dans la prise en charge du CC n'est toujours pas clairement démontré. Chez 15 à 20% des patients, cette prise en charge sera même inefficace et l'on parle alors de CC réfractaire.

Dans ce contexte, de nouvelles techniques d'assistance circulatoire sont actuellement développées dans un double rôle : d'une part assurer le débit cardiaque afin de prévenir ou traiter les défaillances d'organes, et d'autre part mettre au repos le cœur afin de favoriser sa récupération. Actuellement, toute la difficulté pour le clinicien est de trouver la meilleure assistance circulatoire, adaptée à son patient, que ce soit en termes d'efficacité (mise au repos du cœur, débit délivré) ou de sécurité (voies d'abord, hémolyse, infection, fiabilité). En ce sens la recherche préclinique sur ce nouveau type de technique est indispensable afin d'envisager une amélioration de la prise en charge du CC chez les patients.

Le but de notre projet est donc de tester un nouveau dispositif d'assistance circulatoire, actuellement non commercialisé en France, mais qui a cependant obtenu le marquage CE dans le cadre de réouvertures des artères du cœur (angioplastie) à haut risque. Le dispositif d'assistance est introduit dans la cavité cardiaque gauche par voie rétrograde aortique à partir d'une ponction percutanée fémorale. Il est ensuite relié à un ventricule externe permettant d'aspirer le sang dans le cœur gauche puis d'éjecter dans l'aorte. L'expérience de l'utilisation chez l'Homme de ce dispositif reste à ce jour très limitée. L'utilisation de ce dispositif est aujourd'hui limitée à 27 malades pendant quelques heures (1-3h) au cours d'angioplasties à risque. A ce jour, il s'agit d'une assistance non étudiée dans l'indication « choc cardiogénique » lors d'une utilisation plus prolongée. De plus, du fait d'un abord artériel de gros diamètre il existe un haut risque d'occlusion de l'artère d'aval qui perfuse le membre inférieur lors d'une utilisation prolongée. Pour des raisons éthiques évidentes, l'étude de la faisabilité et de l'efficacité d'un support prolongé doit initialement s'envisager dans un modèle animal avant une éventuelle expérimentation humaine.

L'objectif de ce projet de recherche est donc d'étudier l'efficacité (débit fourni) et la sécurité (hémolyse, voie d'abord, ischémie de membre) de ce support prolongé, amélioré d'un système de perfusion rétrograde du membre inférieur chez le porc. En ce sens, le porc est l'animal se prêtant le mieux à cette étude du fait d'un morphotype autorisant la réalisation d'une canulation artérielle fémorale ou iliaque comme réalisée chez l'homme. De plus le débit cardiaque du porc se rapproche de celui d'un homme de morphotype standard (1m70 pour 70 kg) permettant une analyse de l'effet du support circulatoire dans le même temps. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés (16 porcs), nous nous limiterons aux seules expériences considérées comme absolument indispensables. Afin d'éviter les répétitions inutiles, chaque animal sera utilisé pour mesurer plusieurs caractéristiques (physiologiques, anatomiques, biologiques) permettant d'évaluer la faisabilité de l'implantation du dispositif sur une longue durée. Afin de limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, une procédure d'anesthésie à visée anxiolytique, hypnotique et analgésique sera appliquée tout le long du protocole.

7688 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. A l'inverse, une activation inappropriée des plaquettes est responsable de maladies cardiovasculaires, en particulier les thromboses artérielles et les accidents vasculaires cérébraux. Comprendre quels sont les mécanismes d'activation des plaquettes lors des thromboses est un préalable incontournable pour trouver de nouvelles cibles afin de diminuer le risque thrombotique chez les patients à risque. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris transgéniques qui seront étudiées dans des modèles de thromboses bien caractérisés. En parallèle, des prélèvements sanguins seront effectués pour réaliser des mesures *in vitro*. Ces souris modélisent les "maladies du pool vide" dont sont atteints certains patients et qui entraînent des perturbations des fonctions des plaquettes.

Avantages escomptés : Ce projet permettra de comprendre comment certains constituants des plaquettes sont impliqués dans la formation des thromboses et comment cibler ces constituants pour empêcher les récurrences de thrombose artérielle et accidents vasculaires cérébraux chez l'homme.

Remplacer : Pour cette approche de la question scientifique, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études *in vitro*, d'une part car ces essais doivent être menés soit dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes, soit *in vitro* mais en utilisant du sang total, et d'autre part car la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus des protéines dont on cherche à étudier le rôle.

Dommages prévus pour les animaux : Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Les manipulations se font systématiquement sur souris en anesthésie profonde, sans réveil.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition de thrombose *in vivo* ou *in vitro* est fixé à 10, un nombre suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance ANOVA. Les résultats obtenus de l'analyse par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux (les souris). Pour les prélèvements sanguins, nous avons miniaturisé certains tests afin de pouvoir obtenir une mesure avec le sang obtenu par prélèvement d'une seule souris. Au total, nous prévoyons un maximum de 100 souris par génotype, soit 600 souris pour les 6 génotypes que nous allons comparer.

Raffiner : Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible, la thrombose artérielle ou disséminée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Toutes les procédures expérimentales se feront sur des souris endormies. Dans tous les cas, les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et sont manipulées avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention, dans l'intérêt du bien-être animal ainsi que de l'expérimentateur et de l'expérimentation.

7689 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre du développement de composés probiotiques destinés à l'amélioration des troubles métaboliques. L'objectif de la présente étude sera d'évaluer l'impact de 4 composés de type probiotique (composition confidentielle) sur la prise alimentaire, le poids corporel, le profil lipidique et la régulation glycémique chez des souris saines soumises ou non à un régime hyperlipidique pendant 7 à 9 semaines. Deux modalités d'administration seront testées sur deux lots de souris dans le présent projet :

- l'effet curatif des composés sur l'obésité sera testé par une administration orale journalière pendant 5 semaines, cette dernière démarrant 4 semaines après le début du régime enrichi en graisse (durée du régime : 9 semaines)
- l'effet préventif des composés sur l'obésité sera testé par une administration orale journalière pendant 9 semaines, cette dernière démarrant 2 semaines avant le début du régime enrichi en graisse (durée du régime : 7 semaines)

Pour les deux modalités, les paramètres suivants seront mesurés :

- le poids corporel et la prise alimentaire seront mesurés deux fois par semaine
- la glycémie à jeun sera mesurée 5 fois au cours des protocoles
- l'insulinémie à jeun sera mesurée 2 fois au cours des protocoles
- un test de tolérance oral au glucose (OGTT) sera réalisé une semaine avant la fin du traitement, et inclura 7 mesures de Glycémie et 3 mesures d'insuline
- des prélèvements de fèces seront réalisés avant traitement et à la fin de la période de traitement
- un prélèvement d'organe et une ponction cardiaque terminale (pour dosage du profil lipidique) seront réalisés sous anesthésie générale au moment de l'euthanasie des animaux

Un total de 160 souris C57BL/6j sera utilisé, divisé en 2 lots identiques (un par modalité de traitement) de 7 groupes de souris. Chacun des lots sera composé des groupes suivants :

- 4 groupes de 12 souris soumises à l'alimentation enrichie en graisse et traitées avec l'un des 4 probiotiques client

- 1 groupe de 12 souris soumises à l'alimentation enrichie en graisse et traitées avec le véhicule des probiotiques (groupe contrôle)
- 1 groupe de 12 souris soumises à l'alimentation enrichie en graisse et traitées avec un composé de référence (groupe contrôle positif)
- 1 groupe de 8 souris non soumises à l'alimentation enrichie en graisse et traitées avec le véhicule des probiotiques (groupe contrôle du modèle obèse)

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages collectives (3-4 souris/cage) et un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.
- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté pour chaque série expérimentale en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés.
- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

7690 Le rôle central des plaquettes sanguines est d'arrêter les saignements suite à une lésion vasculaire, un processus physiologique que l'on appelle l'hémostase primaire. Suite à une lésion vasculaire, les plaquettes adhèrent, s'activent et agrègent pour former un clou plaquettaire en situation physiologique ou un thrombus en situation pathologique. Dans des conditions pathologiques dans une artère malade, un processus similaire peut survenir et entraîner la formation d'un thrombus qui est responsable de maladies ischémiques graves comme l'accident vasculaire cérébral ou l'infarctus du myocarde, on parle de thrombose artérielle. Cette thrombose représente la complication majeure de l'athérosclérose, une maladie inflammatoire chronique au cours de laquelle, une artère est graduellement épaissie par une plaque fibreuse. A un stade ultime, la plaque occupe une partie importante de la lumière du vaisseau entraînant une sténose artérielle qui modifie profondément la rhéologie locale. S'il est admis que ces modifications de l'écoulement sanguin contribuent à la rupture de la plaque évoluée et amplifie la croissance du thrombus, les mécanismes restent mal appréciés. Le but central de ce projet est d'évaluer et de caractériser *in vivo* les conséquences des modifications des conditions rhéologiques lors d'une thrombose artérielle sur un vaisseau sténosé. Des expériences de thrombose artérielle seront réalisées en formant artificiellement des sténoses à différents degrés pour évaluer l'importance de la perturbation des forces de cisaillement.

Réduction : un modèle *in vivo* de thrombose sur carotide sera utilisé. La chirurgie utilisée dans ce modèle a déjà été décrite, publiée et est maîtrisée au laboratoire. Ceci permettra ainsi d'éviter toute mise au point utilisant des animaux supplémentaires. De plus, le nombre d'animaux utilisés dans chaque groupe sera le plus petit possible, soit 10 animaux, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, ces choix permettront de réduire considérablement le nombre d'animaux nécessaires.

Raffinement : un soin particulier sera apporté afin de diminuer le stress et la douleur de tous les animaux utilisés dans ce projet :

- Hébergement dans des cages munies de particules de bois et enrichie avec un carré en coton compressé et de frisure de papier, afin de permettre aux animaux de réaliser un nid et de compartimenter leur environnement conformément à leurs besoins comportementaux
- Installation de l'animal sur une plaque chauffée à 38°C tout au long de la procédure afin lutter contre l'hypothermie

- Anesthésie de l'animal avant et pendant la durée de l'opération.
- Injection d'analgésique et/ou d'anti-inflammatoire pendant et après chaque procédure.

Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel entraîné.

Remplacement : une première partie de l'étude a été réalisé en utilisant un modèle de thrombose *ex vivo*, disponible au laboratoire. Il s'agit d'un système de perfusion composé de chambres microfluidiques à géométrie variable de très petite taille couplées à un système de microscopie. Des expériences ont été réalisées à partir de sang issu d'un donneur volontaire afin de caractériser *in vitro* l'importance des variations de taux de cisaillement. L'utilisation de ce système s'avère toutefois incomplet, ne pouvant reproduire totalement les conditions hémodynamiques présentes dans les vaisseaux. Ainsi, des expériences complémentaires nécessitant des données *in vivo* seront nécessaires pour compléter et vérifier les résultats obtenus.

Un total de 110 souris sera nécessaire pour mener à bien ce projet.

7691 Les pathologies infectieuses constituent une menace pour le développement durable de l'aquaculture. Ces dernières années, de nombreuses publications scientifiques ont démontré l'existence chez les poissons d'une variabilité génétique sélectionnable et utilisable pour mettre en place des stratégies de lutte contre les agents pathogènes. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la création d'une plateforme collaborative associant des partenaires publics et privés dont l'objectif est l'amélioration génétique de la résistance des poissons d'élevage, et principalement des trois espèces piscicoles françaises majeures (truite, bar, daurade), à différents agents infectieux. La stratégie déployée consistera à sélectionner des individus d'intérêt au sein de populations commerciales en se basant sur la valeur génétique familiale de leurs frères-sœurs infectés expérimentalement en conditions contrôlées. L'ensemble des individus infectés expérimentalement (morts et survivants) seront génotypés à la fin des procédures expérimentales. L'analyse des mortalités quotidiennes et des taux de survie permettra de déterminer l'héritabilité de la résistance pour chacun des pathogènes testés, de tester de nouvelles approches (type puce à ADN) visant à identifier les zones génomiques impliquées dans la résistance et d'améliorer progressivement la survie moyenne des populations de poissons. Les retombées attendues à terme sont une amélioration du bien-être des animaux et de la résistance des lignées commerciales (gain espéré de survie de l'ordre de 2 à 10 % par génération de sélection), une diminution des coûts de production et de l'usage de produits médicamenteux, ainsi qu'une avance technologique des entreprises françaises face aux investissements publics étrangers concurrents dans un secteur très compétitif.

Le présent projet porte sur la réalisation de 18 challenges expérimentaux sur 5 couples poissons - pathogènes : bars / Nodavirus, bars / *Vibrio harveyi*, daurades / *Photobacterium piscicida* subsp. *damselae*, truites arc en ciel / Virus de la Septicémie Hémorragique Virale et truites arc en ciel / virus de la Nécrose Pancréatique Infectieuse.

Le nombre de poissons nécessaire sera de 48 500 juvéniles (12 500 truites, 27 000 bars et 9 000 daurades).

Le critère de mortalité utilisé pour identifier les individus d'intérêt et répondre aux objectifs fixés ne permet pas de remplacer les animaux par des méthodes *in-vitro* ni de fixer de points limites. Les procédures expérimentales ont été élaborées afin de réduire au maximum leur nombre et de les placer dans des conditions d'hébergement optimales (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit, suivi quotidien des animaux deux fois par jour).

7692 Nous étudions l'influence de facteurs (facteurs de transcription) contrôlant l'expression de gènes important pour les programmes de production des cellules sanguines et l'impact de leur mutation dans les leucémies aigües.

Le sang est composé de globules rouges assurant la nutrition de l'organisme et des globules blancs assurant sa défense. Ces cellules sont en nombre contrôlé dans le sang et s'ajustent au besoin de l'organisme (hémorragie, infections etc.).

Toutes les cellules sanguines sont produites à partir de cellules souches dans la moelle des os par un processus de différenciation (spécialisation) appelé hématopoïèse. Lors d'un besoin en cellule

sanguine, les cellules souches reçoivent des signaux (facteurs de croissance) de cellules de la moelle, ces signaux sont intégrés par la cellule souche en modifiant l'allumage ou l'extinction de gènes (par les facteurs de transcription) responsables de la spécialisation des cellules souches en cellules sanguines. Les facteurs de transcription vont alors modifier complètement le programme génique (allumage ou extinction d'autres gènes, appelé gènes cibles) dans la cellule souche et ainsi permettre sa différenciation en globule blanc ou globule rouge. C'est ainsi que l'équilibre (qualité et quantité) des cellules sanguines est maintenu.

Cependant il arrive que ces facteurs de transcriptions soient altérés dans la cellule sanguine (mutation ou absence totale), les cellules en différenciation vont alors mal intégrer les signaux des facteurs environnementaux et changer leur programme de différenciation. Ceci peut avoir plusieurs conséquences : la mort de la cellule, l'arrêt de cette différenciation ou une division anarchique de cette cellule mutée. Dans les deux premiers cas, il y a immunodéfiance. La leucémie est une combinaison des deux derniers cas (blocage et division anarchique). La moelle est alors envahie de cellules non matures (blastes) incapables d'assurer leur fonction et la moelle ne peut plus créer de cellules sanguines entraînant la mort du patient.

Notre travail est de détecter les altérations des facteurs de transcription chez les patients leucémiques et de mimer ces altérations dans des souris pour mieux comprendre leur influence dans le processus cancéreux.

Après avoir déterminé *in vitro* quelles sont les altérations modifiant la spécialisation ou la multiplication des cellules sanguines, nous les mimons *in vivo* (chez la souris) pour vérifier si elles reproduisent la pathologie humaine. Nous avons sélectionné pour les études *in vivo* (grâce à nos résultats *in vitro*) un mutant induisant des leucémies aigües myéloblastiques et une mutation induisant des leucémies aigües lymphoblastiques chez l'Humain. Après avoir mis en place les modèles de souris, nous allons analyser l'apparition de la pathologie et étudier les organes touchés. Nous allons enfin essayer de comprendre comment la pathologie évolue et comment la bloquer.

Nous respecterons la règle des 3"R" : remplacement, réduction et raffinement. Pour cela nous prendrons les mesures suivantes :

Remplacement : Les expériences sur les souris ne sont faites qu'après avoir testé *in vitro* les différents mutants. Seuls les mutants ayant un intérêt biologique seront testés sur l'animal. Cette étape est nécessaire en cancérologie car il est crucial de connaître le devenir des cellules cancéreuses dans un organisme entier afin d'étudier les risques de métastases ou de rechutes après traitement.

Réduction : Les études sur l'animal sont réalisées après une étude bibliographique détaillée afin d'optimiser nos protocoles pour réduire au maximum le nombre d'animaux. Des études statistiques nous permettent également de déterminer le nombre minimum de souris nécessaires afin que l'expérience ait une valeur scientifique et n'est pas besoin d'être reproduite.

Raffinement : En plus des considérations éthiques, nous n'employons que des personnes formées à la manipulation des animaux et soucieuses, à chaque étape, du bien-être de l'animal. Les conditions d'hébergements doivent être optimales en respectant les besoins primordiaux de l'animal (surveillance journalière sans stresser l'animal, non isolement et non surpeuplement des cages, changement très régulier de la nourriture, la boisson et la litière dans la cage). Les animaux sont surveillés quotidiennement par du personnel expérimenté afin de détecter les signes de souffrance. L'évaluation quotidienne de la souffrance nous permet de déterminer si l'expérience doit être arrêtée.

Afin d'être reproductibles, nos expériences nécessitent l'utilisation de 1418 souris pour la totalité du projet (5 ans et quatre modèles de leucémies différents).

7693 La Bretagne est un des plus riches gisements d'algues au monde, unique en Europe, avec près de 600 espèces répertoriées et plus de 300 000 tonnes valorisables annuellement. Parmi elles, certaines macro-algues sont composées de molécules dotées de qualités nutritives et sanitaires. Plusieurs molécules bioactives dérivées d'algues entrent d'ailleurs dans la composition de produits déjà commercialisés. Ce projet a pour objectif global de définir des couples molécules / effets biologiques actifs afin de produire une gamme d'extraits algaux ciblant 3 filières : animaux de rente, animaux de compagnie et nutrition humaine. Il comporte i) une phase technologique visant à développer des procédés d'extraction à haut rendement et éco-efficents des molécules d'intérêt présentes dans les

algues vertes, rouges et brunes ii) une phase de tests et de validation *in vitro* et *in vivo* visant à déterminer les propriétés d'intérêts conférées par les composés algaux (immunomodulation, antimicrobien, effet probiotique, satiété, ...). Dans le cadre du volet piscicole de ce programme, des essais expérimentaux seront réalisés chez la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*). L'état de santé sera évalué chez le poisson alimenté par les différents extraits d'algue, après avoir été exposé à une contamination chimique à la pendiméthaline, un herbicide que l'on peut retrouver dans les cours d'eau. Pour ce faire, une procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R, à savoir la réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique et le raffinement des conditions d'hébergement. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions optimales d'hébergement des animaux (volume d'eau adapté avec renouvellement en continu, rythme jour/nuit naturel). En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, l'utilisation de la truite arc-en-ciel étant nécessaire puisque c'est une espèce-modèle en écophysiologie et qu'aucune méthode alternative n'a encore été développée pour réaliser ces travaux. Au total, 180 truites serviront à l'évaluation des pouvoirs immunostimulants et antioxydants de deux extraits d'algues. Le suivi du comportement individuel et l'analyse d'échantillons de sang et de foie prélevés lors de l'expérimentation permettront d'obtenir une évaluation complète des effets possibles des extraits d'algue chez la truite arc-en-ciel.

7694 Les coccidies sont des organismes unicellulaires parasites obligatoires du tube digestif de nombreux animaux, retrouvés très fréquemment chez les volailles. Elles posent des problèmes sanitaires et économiques dans les élevages de volailles, notamment de poulets. Si des mesures d'hygiène rigoureuses peuvent réduire le risque d'infection, elles sont le plus souvent insuffisantes. Les approches préventives par usage d'anticoccidiens dans l'aliment peuvent conduire à l'émergence de résistance chez les populations de coccidies, affaiblissant l'intérêt et l'efficacité de ces molécules. Les approches vaccinales sont coûteuses et parfois difficiles à mettre en œuvre correctement. Selon la recommandation de la commission de l'UE, le développement et l'évaluation d'alternatives aux méthodes existantes est nécessaire. Le but de cette étude est d'évaluer des produits (une trentaine) susceptibles d'enrichir les moyens de lutte contre les coccidioses, dans un modèle de reproduction expérimentale de la coccidiose chez le poulet. Pour ce faire, au maximum 7200 volailles d'un jour d'âge obtenues à partir de couvoirs conventionnels seront élevées par lots successifs pendant les 5 années du programme. Cet effectif a été calculé sur la base d'essais antérieurs pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, tout en permettant de tester à chaque expérimentation un nombre élevé de lots. A 15 jours d'âge environ, les oiseaux seront pesés et identifiés par une bague alaire avant d'être répartis aléatoirement à l'un des lots du dispositif expérimental (maximum : 12 lots dont 2 témoins). A partir de cette date jusqu'à la fin de la phase expérimentale, ils recevront de l'eau et de l'aliment supplémenté ou non, suivant leurs groupes de traitement. Ils seront inoculés expérimentalement avec des souches de coccidies dont la pathogénicité aura été déterminée au préalable. A la fin de la phase expérimentale, au cours de laquelle, des critères zootechniques (poids, consommation alimentaire et mortalité) ou pathologiques (morbidity, excrétion des oocystes et aspect des matières fécales) auront été notés, les animaux seront euthanasiés pour la description des lésions intestinales. Dans l'état actuel des connaissances, l'évaluation de l'activité anticoccidienne repose sur la comparaison des performances zootechniques et la description des lésions intestinales, d'où la nécessité d'utiliser les oiseaux dans un modèle d'infection expérimentale. Tous les efforts en vue de réduire le nombre d'animaux seront entrepris lors des différentes expérimentations. Les procédures ne devraient être à l'origine d'aucune souffrance. Les doses d'oocystes permettront de reproduire un épisode de coccidiose avec des signes cliniques transitoires, ne dépassant pas les limites de tolérance établies, sans quoi les oiseaux seront euthanasiés. A la fin de la procédure, les oiseaux seront euthanasiés un par un.

7695 Le développement de l'aquaculture est étroitement lié aux coûts de production, ce qui induit aujourd'hui des pratiques d'élevage visant à maximiser l'ensemble des procédés mis en œuvre. Les systèmes de production aquacole en recirculation (RAS) développés dans ce sens représentent une alternative durable à faible impact écologique. En RAS, les poissons peuvent cependant être exposés à des facteurs de stress (ex : densité, qualité de l'eau) qui peuvent être préjudiciables à leur santé (sensibilité aux pathogènes, stress chronique...). L'influence de ces stress sur le bien-être des poissons doit être mesurée et mieux comprise en intégrant le comportement individuel des animaux :

les traits de personnalité qui composent le coping style. Ce terme anglo-saxon 'coping style', recouvre la façon particulière à un individu de faire face à un changement environnemental selon ses capacités d'adaptation physiologiques et comportementales. L'objectif du projet est donc une meilleure compréhension des réponses individuelles (comportementales et physiologiques), en lien avec des facteurs environnementaux pour améliorer les pratiques d'élevage. Concernant les réalisations spécifiques à cette demande *Dicentrarchus labrax* d'autorisation de projet, elles consistent à classer un lot de 3000 jeunes bars () individuellement marqués avec une puce électronique RFID (procédure 1) en fonction de leur audace et de leur activité distinguant deux groupes d'animaux, les proactifs vs les réactifs formant les extrêmes du coping style (procédure 2). Ensuite l'interaction entre coping style et environnement d'élevage sera étudiée en comparant les performances de croissance des bars des deux groupes entre deux conditions d'élevage distinctes en terme de qualité d'eau (procédure 3). Des prélèvements seront analysés afin d'évaluer le niveau de stress (cortisol) et de neurotransmetteurs cérébraux sur 120 échantillons au total (15 x deux types comportementaux x deux conditions d'élevage x deux points de mesure (à 50 et 100g)). Au total 3000 bars seront utilisés dans ce projet.

Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et sont toujours élevés en groupe dans des structures d'élevage adaptées à l'espèce avant et après l'application des procédures (Raffinement). Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage.

7696 A terme, le but du projet est d'améliorer la survie et la croissance avant sevrage des animaux d'élevage.

Le but des évaluations génétiques est d'estimer le potentiel génétique des animaux afin de sélectionner les futurs reproducteurs. A la condition d'une bonne estimation de ce potentiel, le caractère sélectionné s'améliore dans la population au fur et à mesure des générations. Certains caractères ont la particularité de dépendre d'effets maternels. Dans ce cas la mère et son petit (et donc leurs gènes) influencent le caractère mesuré ce qui complique fortement l'estimation du potentiel génétique des animaux. Bien que les modèles d'évaluation génétique de ce type de caractères aient été développés il y a de nombreuses années, il n'est pas rare d'obtenir des estimations surprenantes des paramètres génétiques avec de tels modèles (corrélation fortement négative entre les effets génétiques du jeune et ceux de sa mère par exemple). Autrement dit, le potentiel génétique des animaux n'est probablement pas estimé correctement. Notre hypothèse scientifique est que les estimations des paramètres sont biaisées par l'existence de facteurs non pris en compte dans les modèles et qui sont confondus avec les effets maternels génétiques. Ces facteurs de confusion sont : l'héritage mitochondrial, l'empreinte parentale et l'héritage environnemental. Il a en effet été montré, théoriquement et sur simulations, que ces phénomènes biaisaient les estimations des modèles à effets maternels. Néanmoins on ne connaît pas l'importance de ces phénomènes pour les caractères d'intérêt de nos espèces de rente (croissance et survie avant sevrage notamment) car aucune étude n'a jamais tenu compte de l'ensemble de ces facteurs simultanément pour étudier les effets maternels. Pour répondre à ce problème, nous proposons : 1) un protocole expérimental en lapin (animal modèle) permettant, grâce à des plans d'accouplement particuliers et des adoptions croisées, d'estimer simultanément ces effets (donc lever toute confusion) et 2) un nouveau modèle d'évaluation génétique qui puisse prendre en compte tous ces facteurs simultanément afin d'obtenir des estimations non biaisées du potentiel génétique des animaux. L'application de ce modèle sur les porcs permettra en pratique d'améliorer la croissance et la survie du jeune en élevage.

Ce protocole a été réfléchi afin de :

1) Réduire le nombre d'animaux nécessaires pour détecter significativement des croissances ou des survies différentes en fonction des facteurs pouvant les influencer. Pour maximiser la puissance des tests avec un nombre minimal d'animaux, nous allons produire 3 générations (F0, F1, F2) de lapins issus du croisement entre deux groupes d'animaux différents sur leur croissance et leur survie avant sevrage. Les 200 animaux F0 donneront naissance en tout à 6400 descendants sur 17 mois (2 générations F1, F2). Ce nombre de descendants a été calibré afin d'avoir la puissance nécessaire pour pouvoir estimer correctement les effets des différents facteurs par un modèle génétique. Parmi

ces animaux, 1916 auront une biopsie d'oreille (procédure 1) et 40 recevront un traitement de superovulation (procédure 2). 100 animaux de la F0 seront nés de transferts d'embryons par chirurgie dans 40 femelles (procédure 3).

2) Raffiner : tout en restant proche des conditions d'élevage classiques, le protocole a été construit afin de pouvoir lever la confusion entre les différents facteurs (génétique et non génétique) agissant sur la croissance et la survie avant sevrage. Le protocole repose pour cela sur des accouplements entre animaux présentant une variabilité génétique importante et des adoptions croisées entre environnements maternels différents. L'environnement maternel sera évalué par des mesures de la qualité du nid (température, hygrométrie) qui ne sont pas réalisées en élevage traditionnel. De plus, nous allons utiliser des données de génotypage pour obtenir l'information nécessaire à la distinction des différents facteurs de confusion des effets maternels.

3) Remplacer : L'espèce cible visée dans notre projet est le porc. Le lapin a été choisi comme animal pour le protocole pour différentes raisons : a) le lapin est une espèce clef comme modèle du porc (proliféricités similaires, caractères sélectionnés et schémas de sélection proches), b) l'intervalle entre générations est court en lapin ce qui permet de réaliser le protocole en un temps raisonnable, c) la diversité génétique du lapin est plus importante que celle obtenue avec des lignées de rongeurs ce qui en fait un meilleur modèle des animaux d'élevage, d) les effets maternels sur la croissance et la survie sont importants dans cette espèce et donc plus facile à analyser avec un plus faible nombre d'animaux e) contrairement aux autres espèces, l'environnement maternel est facilement mesurable en lapin par une mesure de la qualité du nid.

Durant toute la durée du protocole, les animaux seront élevés dans les mêmes conditions qu'un élevage traditionnel respectueux du bien-être animal. Seule une partie d'entre eux subira une procédure expérimentale de sévérité légère (1956 animaux, biopsie du cartilage ou traitement de superovulation) ou modérée (40 animaux, transfert d'embryons). Tous les moyens seront mis en œuvre afin de limiter au maximum le stress et la douleur de l'animal au cours de ces procédures (manipulation par les animaliers habituellement en charge des animaux, traitement de la douleur post-opératoire).

7697 La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert potentiel dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de l'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques généralement stables et difficilement destructibles. Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité,...). Les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) ont impacté significativement certains sols agricoles dans les régions accidentellement ou historiquement contaminées. Ces molécules ont été interdites en France depuis des décennies mais elles sont encore présentes dans les sols pour plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre significatif de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR et donc impropres à la consommation.

L'étude du devenir de la chlordécone chez les ruminants constitue un enjeu scientifique majeur. Les résultats de l'étude contribueront à la pérennité des systèmes d'élevage antillais et à la protection des consommateurs. Même si des approches de cette nature ont été menées précédemment chez les bovins, caprins, porcins et la volaille, aucune donnée n'existe chez l'ovin qui pourtant est une espèce très présente aux Antilles. Malheureusement il ne sera pas possible de se passer de l'expérimentation in vivo du fait de l'absence de modèles in vitro, ex vivo ou in silico adéquats. Mais nous limiterons les interventions sur animaux à des poses ponctuelles de cathéters et de sondes urinaires.

La chlordécone est connue pour être métabolisable chez les porcs, les gerbilles et les hommes. Cette métabolisation s'effectue au niveau du foie où il y a formation de chlordécol et de métabolites

conjugués. Le chlordécol tout comme la chlordécone sont principalement éliminés via les fèces. Les métabolites conjugués le sont via les urines.

Ce projet permettra d'affiner les stratégies de décontamination des ovins à travers la détermination du temps de demi-vie de la molécule, l'étude de la linéarité de la toxicocinétique et la recherche des métabolites dans les matrices sang, urines et fèces.

Afin de mener à bien cette expérimentation, 16 brebis adultes non lactantes, non gestantes et en fin de croissance seront nécessaires. Nous réduirons le nombre d'animaux en expérimentation sur la base de (i) la répétabilité des mesures analytiques dans le domaine de l'analyse des polluants et (ii) l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les petits ruminants. Trois doses de CLD seront administrées à des niveaux pouvant simuler une exposition environnementale. La dose maximale de CLD choisie est bien inférieure à la dose toxique pour l'ovin. Un maintien des animaux en boxes individuels connectés les uns aux autres sera nécessaire pour permettre la collecte sanguine, urinaire et fécale. Toutefois, pour le bien-être des animaux, le contact visuel, auditif et olfactif seront préservés. De même des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes des brebis.

Une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement. On considèrera que pour toute chute de poids de plus de 15% en 3 jours impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abattement profond.

7698 L'ensemble du corps humain et plus particulièrement l'intestin hébergent une communauté bactérienne résidente (microbiote), abondante et complexe, qui assure des fonctions essentielles pour la bonne santé de l'hôte ou au contraire le développement de maladies métaboliques ou cardiovasculaires. Le projet de recherche consiste à la mise en place d'une plateforme qui propose des modèles expérimentaux de souris « humanisées » avec différents microbiotes issus de patients sains ou atteints de pathologies telles que le diabète, l'obésité ou encore l'insuffisance cardiaque.

Par des approches nutritionnelles et chirurgicales, l'obtention de ces modèles permettra la compréhension de l'apparition de ces maladies. Ces modèles permettront également d'étudier l'implication du microbiote intestinal dans ces pathologies et développer des stratégies de traitement.

Le modèle métabolique est induit sur les animaux humanisés par une mise sous régimes spécifiques enrichis en graisse. Les désordres métaboliques induits par ces régimes sont caractérisés par des tests de tolérance au glucose, des mesures des échanges respiratoires, des mesures de la sensibilité à l'insuline et un suivi longitudinal de la prise de poids. Dans le cas d'obésité, toujours obtenue par un régime spécifique enrichi en sucre et en graisse, un modèle de chirurgie gastrique est mis en place (la gastrectomie consiste à retirer une grande partie de l'estomac, pour former un tube) afin d'évaluer l'efficacité de cette chirurgie en fonction du régime et du microbiote implanté. Pour la réalisation de ces différentes caractérisations, en fonctions des différents régimes et microbiotes, nous estimons que nous utiliserons 4640 animaux sur 5 ans.

Le modèle cardiovasculaire peut être induit sur les animaux humanisés par trois techniques chirurgicales différentes. Un premier modèle consiste à la réalisation d'un infarctus du myocarde, un deuxième consiste en un rétrécissement partiel du diamètre de l'aorte de 0.46mm afin de reproduire les effets de l'insuffisance cardiaque humaine et un troisième modèle consiste à la réalisation d'une occlusion de l'artère cérébrale afin de reproduire les effets d'un accident vasculaire cérébral. Ces trois modèles chirurgicaux peuvent également être réalisés sur des souris humanisées sous régimes enrichis en graisse. Ceci permet d'étudier les risques cardiovasculaires associés à un désordre métabolique. Pour la réalisation de ces différents modèles, en fonctions des différents régimes et microbiotes, nous estimons que nous utiliserons 7680 animaux sur 5 ans.

Notre protocole expérimental respecte la règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement. Les procédures utilisées ne peuvent malheureusement pas être substituées par des procédures *in vitro* car elles mettent en jeu des interactions complexes entre l'hôte et le microbiote que la culture de cellules en tapis ne saurait reproduire. Il est donc nécessaire de recourir à un modèle animal. Le modèle le plus approprié pour ce projet comprend actuellement l'utilisation de souris. Le nombre d'animaux utilisés est réduit pour atteindre une valeur minimale sans nuire à la qualité statistique des données.

Les animaux sont hébergés dans une structure et des conditions parfaitement adaptées (Litière changée régulièrement, eau et nourriture à volonté, température et hygrométrie régulée). Les animaux bénéficient également d'un enrichissement de leur milieu (type feuille de cellulose, permettant une diminution du stress potentiel et la réalisation de petits nids par les animaux). Une surveillance journalière est mise en place.

De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures chirurgicales se déroulent sous anesthésie. Des antalgiques sont également prévus pour limiter les douleurs post-chirurgicales. Chaque animal opéré fera l'objet d'un suivi post-opératoire. Des points-limites précoces et adaptés sont établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

7699 Les laboratoires de recherche privés ou académiques comptent dans leurs rangs de nombreux techniciens qui interviennent directement dans la mise en œuvre de projets scientifiques utilisant des animaux vivants. Ces projets ont pour but d'améliorer à la fois nos connaissances mais aussi la santé humaine ou animale. L'enseignement universitaire vise à former des techniciens supérieurs qui sont recrutés par les laboratoires. La formation porte en moyenne chaque année sur environ 120 étudiants. L'objectif de ce projet est d'assurer les compétences des agents recrutés et de former au mieux les étudiants sur la base de travaux pratiques (TP) chez le rongeur. Les TP seront réalisés sur l'animal anesthésié avec mise à mort avant réveil ou sur animaux vigiles. Les étudiants seront formés à la pharmacologie des systèmes, à la physiologie des fonctions mais aussi à l'analyse comportementale, en passant par l'apprentissage des techniques élémentaires d'administration, de prélèvement et de chirurgie. Le degré de gravité des procédures appliquées est sans réveil pour 7 d'entre elles, léger pour celle utilisant des souris vigiles et modéré pour celle utilisant des rats vigiles. Le nombre d'animaux pour mener à bien ces objectifs est de 502 souris, 378 rats et 48 cobayes (928 animaux/an) soit 4640 pour 5 ans. Du fait des requis pour la formation de techniciens, aucune méthode alternative non-animale n'est ici adaptée. Sur la base de l'expérience des années passées et en conformité à la règle des 3R (suivi du statut sanitaire des animaux, la plupart des expérimentations sont réalisées sans réveil, en cas de stimulation douloureuse le stimulus est infraliminaire et d'une durée minimale, le nombre des TP réalisés ainsi que le nombre d'animaux par TP sont limités à la quantité minimale suffisante pour atteindre les objectifs). Les espèces choisies sont celles qui sont les plus utilisées dans les travaux de recherches fondamentales ou appliquées, à savoir le rat, la souris et le cobaye. Tous nos animaux sont euthanasiés par prolongation surdosée de l'administration systémique d'un anesthésique général.

7700 Ce projet a pour objectif de comprendre les mécanismes neurobiologiques sous-tendant les troubles cognitifs chez des patients souffrant de dépression majeure résistante aux traitements pharmacologiques. La stimulation du cortex infralimbique améliore la mémoire, tandis que la lésion des cellules gliales de cette région fait disparaître cet effet bénéfique. Cette recherche translationnelle est nécessaire pour démontrer de façon plus directe l'implication des astrocytes dans les processus de la mémorisation. Il a été démontré que les événements de vie stressant augmentent le risque de dépression, en conséquence, certains modèles animaux de dépression utilisent l'activation de l'axe corticotrope par l'ACTH afin de reproduire une partie de la physiopathologie de cette maladie. Cette étude sera effectuée chez un animal entier pour que le comportement dans un test de mémoire puisse être observé. Ce travail expérimental sera réalisé en utilisant deux modèles animaux de dépression, des rats Wistar Kyoto (WKY) et des rats traités à l'ACTH. Ces deux modèles sont complémentaires puisque le premier est associé à de l'anxiété et le deuxième est résistant aux antidépresseurs. Un nombre total de 120 rats sera utilisé : 30 rats Wistar Kyoto et 30 rats Sprague-Dawley standard comme témoins ; 30 rats Sprague-Dawley traités à l'ACTH et 30 rats traités au sérum physiologique. Le traitement par l'ACTH présente une sévérité de classe légère. Les mises au point techniques pourront être réalisées en réutilisant plusieurs fois le même animal ; par contre, les résultats finaux devront être obtenus sur plusieurs animaux afin de tenir compte de la variabilité interindividuelle caractéristique du vivant. En fonction des premiers résultats, le nombre pourra être revu à la baisse. La mémoire sera évaluée aux niveaux comportemental et électrophysiologique et les expériences d'électrophysiologie pourront se faire sur les rats ayant servi à l'évaluation comportementale. Ceci limite au final le nombre nécessaire d'animaux. L'infusion du vecteur pour activer spécifiquement les astrocytes, ainsi que les expériences d'électrophysiologie présentent un niveau de sévérité modéré,

mais le geste chirurgical sera précédé d'une anesthésie générale et de l'application locale d'un analgésique. L'intervention chirurgicale peut entraîner une légère perte de poids. Les plans expérimentaux tenant compte de la variabilité interindividuelle prévoient l'utilisation minimum de 15 rats par groupes selon le test statistique PS de Dupont et Plummer. Tous les animaux seront mis à mort après l'expérience d'électrophysiologie. Cette recherche durera 5 ans.

7701 La protéine X va être utilisée dans un protocole clinique de thérapie cellulaire en tant que réactif dans une culture de cellules souches participant à la formation de globules sanguins. Au bout de 7 jours de culture, les cellules sont lavées avant d'être injectées à des patients. La protéine X est présente en quantités très faibles dans le produit de thérapie cellulaire injecté. La protéine X n'ayant jamais été utilisée dans un essai clinique, il est indispensable d'évaluer sa toxicité dans un modèle murin.

Le protocole clinique inclura des patients d'âge adulte ou pédiatrique (moins de 1 an), des deux sexes. La toxicité sera donc évaluée avec des souris C57Bl/6J des deux sexes. Les souris seront âgées de 3 semaines pour le groupe 2 permettant de se rapprocher le plus possible chez l'homme de l'enfant jeune. Le groupe 3 des souris de 7 semaines (souris adultes), vise à se rapprocher de l'adulte chez l'homme. Enfin pour le groupe 1 (contrôle), des souris de 5 semaines ont été choisies pour avoir un contrôle entre les deux types d'âges identifiés pour l'essai et limiter ainsi le nombre d'animaux.

La dose de protéine X testée correspond à 10 fois la dose maximale que recevront les patients.

Au total, 30 animaux seront utilisés :

- Groupe 1 : 5M/5F de 5 semaines injectés avec 100 µL de PBS 1X en intraveineux (veine caudale)
- Groupe 2 : 5M/5F de 3 semaines injectés avec 100 µL de la protéine X en intrapéritonéal
- Groupe 3 : 5M/5F de 7 semaines injectés avec 100 µL de la protéine X en intraveineux (veine caudale)

Les animaux seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de souffrance animale : prostration, apathie, etc. Un suivi hebdomadaire du poids permettra également d'identifier le point limite si une perte de poids de plus de >20% venait à être décelée.

Les animaux seront gardés 90 jours puis seront euthanasiés pour prélèvements histologiques.

Ce projet a été validé scientifiquement auprès de l'ANSM et s'ancre dans un contexte réglementaire de phase préclinique.

7702 Les maladies psychiatriques et neurologiques, telles que la schizophrénie et la maladie d'Alzheimer par exemple, sont caractérisées par des troubles de la mémoire et des fonctions intellectuelles supérieures. Lors du développement de médicaments visant à traiter ces troubles, il est nécessaire de les tester chez le rongeur afin de déterminer leur efficacité et d'établir les doses efficaces. Il est possible d'évaluer cette efficacité sur des animaux sains dans différents tests de mémoire non aversifs permettant ainsi d'obtenir des données importantes pour la progression des candidats médicaments dans des études cliniques.

L'étude des phénomènes de mémoire nécessite l'utilisation d'animaux, ceci ne pouvant pas se faire sur des cellules nerveuses. Nous utiliserons des souris C57BL6J mâles adaptées aux études des phénomènes de mémoire.

Ce projet de 5 ans consiste à tester 10 candidats médicaments par an. Chaque composé est testé à trois doses, ces doses n'étant pas toxiques pour l'animal et n'induisant pas d'effets indésirables qui rendraient l'étude de la mémoire impossible. Pour chaque étude, il est nécessaire d'ajouter un comparateur dont les effets sur la mémoire sont connus. Soit un total de 3000 souris

Afin de pouvoir évaluer la mémoire, les animaux ne doivent pas être stressés et indissociables des animaux naïfs. Les animaux sont hébergés en cages collectives contenant de l'enrichissement environnemental (raffinement). Si une altération de l'état général de l'animal est observée, l'animal sera mis à mort immédiatement.

Le candidat médicament sera administré aux animaux plusieurs jours avant les différents tests de mémoire. Ces tests de mémoire sont au nombre de 2. Le nombre d'animaux utilisés est le nombre

nécessaire et suffisant afin d'obtenir des résultats qui peuvent être interprétés statistiquement (réduction) mais sans en utiliser plus que nécessaire.

Test de mémoire spatiale spontanée : Impliquant une structure cérébrale, l'hippocampe, qui fonctionne mal chez les patients souffrant de la maladie d'Alzheimer, de Parkinson ou de schizophrénie par exemple. Ce test repose sur l'exploration libre, donc non stressante, de deux compartiments topographiquement différents.

Test de mémoire visuelle des objets : Ce test impliquant, chez le rongeur et chez l'homme, une structure bien définie, le cortex perirhinal, repose sur l'exploration libre et donc non stressante de deux objets différents. Les patients souffrant de la maladie de Parkinson, de la maladie d'Alzheimer (phase précoce) et de schizophrénie présentent des troubles similaires.

A la fin de l'étude tous les animaux seront mis à mort, le sang et le cerveau seront prélevés afin d'obtenir un maximum d'information concernant le candidat médicament et ainsi éviter d'utiliser d'autres animaux pour obtenir ces données (réduction).

7703 L'objectif de ce projet est d'étudier la survenue d'une crise d'épilepsie dans des souris modèles de l'Ataxie Spino-Cérébelleuse de type 31 (SCA31). Cette ataxie est la troisième cause génétique la plus fréquente d'ataxie (manque de coordination fine des mouvements volontaires) au Japon. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une perturbation du fonctionnement des neurones, notamment de leurs récepteurs au NMDA, à la glycine et au GABA, conduisant in fine à la mort de ces neurones. Nous avons généré des souris transgéniques portant la mutation SCA31 pour étudier cette maladie. Ayant observé de rare crise d'épilepsie spontanée chez ces souris, nous souhaitons mieux étudier ce phénotype. La compréhension de l'effet de cette mutation SCA31 sur le fonctionnement du cerveau nous permettra de mieux comprendre ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes d'épilepsie. De plus, le modèle de souris transgénique que nous avons développé présente la même mutation que les patients humains et ces souris présentent des altérations fines du contrôle de la coordination de leur mouvement.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous étudierons l'apparition de crise épileptique après traitement avec des doses faibles de Pentylène tetrazol (PTZ, une substance proconvulsivante) qui ne devraient pas engendrer la mort de l'animal. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet un total de 36 animaux (12 souris contrôles, 12 souris hétérozygotes pour la mutation SCA31 et 12 souris homozygotes pour la mutation SCA31) seront testés lors de la procédure expérimentale. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux prélevés post-mortem pour éviter un doublon des procédures expérimentales.

7704 La nécessaire réduction de l'utilisation des antibiotiques en production avicole est un enjeu majeur dans la lutte contre l'apparition de résistances à ces molécules et pour la préservation de leur efficacité. Ainsi, renforcer la santé des animaux est un axe de travail pertinent dans la lutte contre l'apparition de maladies afin de contribuer à l'amélioration des conditions d'élevage des volailles et de leur bien-être. Les premiers jours de vie des volailles sont cruciaux pour la mise en place de leur système immunitaire. Les anticorps maternels protègent les poussins pendant quelques jours mais ceux-ci doivent rapidement développer leurs propres mécanismes de défense. De nombreux facteurs peuvent retarder ou limiter le développement du système immunitaire des poussins comme, par exemple, la durée de stockage des œufs avant incubation ou, en élevage, une mauvaise maîtrise des températures dans les bâtiments. Dans les conditions de production, un stockage long est parfois

nécessaire lorsque le marché cible est fortement saisonné. Les poussins sont alors plus fragiles et susceptibles de ne pas pouvoir se défendre efficacement contre une contamination précoce ou un stress en élevage. Les probiotiques, qui sont constitués de bactéries ou levures bénéfiques pour la santé, pourraient être de bons candidats au renforcement du système immunitaire du poussin. L'objectif de cet essai est de mesurer l'intérêt comparé de trois probiotiques (deux probiotiques test et un probiotique du commerce) dans l'amélioration de la santé des volailles. L'étude est menée sur 1440 poussins à croissance rapide répartis dans 36 parquets de 40 animaux chacun. Le nombre d'animaux est optimisé par l'étude statistique préalable (BiostaTGV/Etude Clinique/Calcul du nombre de sujets nécessaires). Les analyses statistiques des données issues de l'essai sont réalisées par ANOVA à l'aide des logiciels Expé-R et Statview. Le protocole utilisé pour la validation des probiotiques implique la comparaison des résultats zootechniques des volailles élevées dans des conditions proches de celles d'un élevage classique, au sol sur litière avec un accès illimité à l'eau et à l'aliment. Un léger stress thermique ainsi qu'une modification de la présentation de l'aliment serviront d'éléments déclencheurs de la réponse immunitaire. Durant la période expérimentale une attention particulière sera portée au comportement des animaux afin de prévenir toute angoisse, souffrance ou douleur excessive.

7705 Ce projet s'inscrit dans le domaine de la recherche préclinique, avec pour but de développer de nouveaux traitements contre certains types de tumeurs notamment pulmonaires.

72 souris seront utilisées pour ce projet pour deux études s'inscrivant dans le cadre de développement de futurs vaccins ciblant des tumeurs se développant au niveau pulmonaire.

La première étude s'intéressera à la réaction locale induite lors de l'injection sous-cutanée des traitements. Les animaux recevront l'injection au niveau de la peau du produit et le lendemain seront mis à mort pour prélever la peau au niveau du site d'injection.

La seconde étude étudiera la réaction générale de l'organisme, et non locale. Pour cela, les animaux recevront deux séries d'injections de traitements, espacées d'une semaine, puis après mise à mort, les rates seront collectées pour une analyse des populations immunitaires. Ces deux études se complètent et permettront d'apporter de nombreuses informations sur la capacité des traitements à entraîner une réponse appropriée dans le cadre d'une approche thérapeutique. Les animaux seront observés quotidiennement pour s'assurer que leur état de santé n'est pas détérioré. Les points limites de mise à mort pour raison éthique seront liés au poids de l'animal, à son état de santé et à d'éventuels signes de souffrance afin d'éviter une souffrance de l'animal.

Le nombre d'animaux a été défini grâce aux données préalablement établies par notre partenaire. Ainsi, les effectifs des groupes ont été adaptés selon les expériences pratiquées. Ainsi l'étude de réaction locale, 4 animaux seront utilisés par condition. Pour l'étude ciblant la rate, 5 animaux par conditions seront utilisés. Cela constitue l'effectif minimum utilisable vis-à-vis des analyses effectuées et des analyses statistiques employées.

Ce type de protocole ne peut pas être remplacé par une approche alternative n'utilisant pas d'animaux, en effet, l'étude porte sur un organisme vivant complexe, afin d'exprimer l'ensemble des marqueurs et des caractéristiques des tumeurs que l'on cherche à traiter.

Des expériences cellulaires ont eu lieu au préalable pour mettre en évidence le potentiel thérapeutique des virus utilisés dans ce projet.

De plus, dans le cadre du développement de nouveau traitement, il apparaît que ce type de protocole est efficace et s'avère nécessaire pour plusieurs nouveaux candidats. Ainsi, nous proposons de le reproduire dans les mêmes conditions, de manière répétée pour les projets à venir, dans une rythmicité de 5 par an. Soit un total potentiel de 360 animaux utilisés par an ou 1800 animaux théoriques sur 5 ans. Néanmoins, il convient de préciser que tous les efforts seront entrepris pour éviter une utilisation d'animaux ne présentant pas d'intérêt dans le développement de nouveaux candidats thérapeutiques.

7706 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. Certains cas de déficiences plaquettaires aiguës ou chroniques, qui peuvent être héréditaires ou bien acquises (par exemple lors des chimiothérapies anticancéreuses) ne peuvent actuellement être traitées que par la

transfusion de concentrés plaquettaires. Ces concentrés plaquettaires sont issus du don de sang et représentent une ressource limitée. La production de plaquettes *in vitro*, en vue de pouvoir un jour suppléer au don de sang, en est encore à ses balbutiements et nécessite encore une recherche fondamentale pour comprendre les mécanismes en jeu. *In vivo*, la formation des plaquettes sanguines a lieu dans la moelle osseuse, à partir de cellules hématopoïétiques spécialisées : les mégacaryocytes. Les mécanismes par lesquels ces cellules libèrent les plaquettes sont encore mal connus, mais seraient sous la dépendance de la polymérisation des microtubules. Dans le but d'élucider les mécanismes qui président à la libération de plaquette *in vivo*, nous souhaitons utiliser une technique de visualisation de la formation des plaquettes en temps réel. Pour cela, nous utiliserons des souris dont les précurseurs des plaquettes présentent une fluorescence verte. Sous anesthésie générale et analgésie, nous observerons la moelle du crâne directement à travers l'os (cette zone est translucide chez la souris) afin de visualiser en temps réel la libération de plaquettes fluorescentes dans la microcirculation sanguine. Cette observation utilisera une technique de pointe, la microscopie confocale multiphoton, afin de limiter les dommages causés au tissu et d'obtenir un maximum d'information tout en limitant le nombre d'animaux utilisés. Nous comparerons la manière dont les plaquettes sont formées dans les souris présentant un défaut de microtubules par rapport aux souris témoins. Après manipulation, les souris seront euthanasiées avant leur réveil afin d'éviter toute souffrance. Le nombre de souris sera réduit par l'utilisation d'un objectif de faible grossissement, ce qui permet d'observer un champ large et ainsi un grand nombre d'événement. Le traitement informatique ultérieur des images compensera la moins bonne résolution due à l'utilisation de cet objectif et ainsi contribuer à diminuer le nombre de souris. Ainsi le projet fera appel à 50 souris contrôles, 50 souris mutées sur la tubuline alpha4 et 50 souris déficientes en tubuline b1. L'angoisse des animaux est minimisée par l'utilisation de litière fraîche et de coton cardé dans la cage pour les maintenir au chaud pendant le transport. La douleur est réduite du fait de l'anesthésie et analgésie avant toute procédure invasive.

7707 La transplantation hépatique chez l'adulte est le traitement de choix des maladies du foie en phase terminale. Le succès de ce traitement a mené à une augmentation constante des patients inscrits sur liste d'attente sans augmentation parallèle des organes (ou greffons) disponibles. La transplantation à partir d'un donneur vivant, le partage d'un greffon cadavérique entre deux receveurs et l'utilisation de greffons à critères étendus (foies de mauvaise qualité, greffons ayant subi un temps de conservation prolongé) font partie des méthodes développées pour pallier cette pénurie de greffons.

Les modifications de pressions et débits sanguins varient d'un patient cirrhotique à l'autre. Certains patients développent un hyperdébit sanguin à cause de la cirrhose qui joue le rôle d'obstacle. Chez ces patients et ainsi que chez les patients bénéficiant d'une transplantation d'un greffon partagé ou venant d'un donneur vivant (c'est-à-dire d'un greffon partiel), ce hyperdébit sanguin persistant malgré la disparition de l'obstacle aurait un effet délétère sur le "nouveau" foie.

Une meilleure compréhension de cet effet délétère causé par l'hyperdébit permettrait de l'éviter (en modifiant certains paramètres hémodynamiques pendant la transplantation hépatique) et d'améliorer les résultats postopératoires après transplantation de greffon partagé, de donneur vivant ou à critères étendus.

Dans ce but, nous proposons dans un premier temps de mettre en place un modèle porcin d'hyperdébit. Dans un deuxième temps nous évaluerons le retentissement de cet hyperdébit dans un contexte de transplantation hépatique de foie total.

La règle des 3 R a été prise en compte. Le nombre d'animaux par groupe sera réduit au minimum et permettra de réaliser des tests statistiques pour identifier des différences biologiques et histologiques entre les groupes. Au total, 30 animaux seront nécessaires. Le premier groupe sera constitué de 5 porcs alors que les deuxième et troisième seront constitués chacun de 10 porcs. Nous incluons 5 animaux supplémentaires au total pour compenser les animaux perdus lors d'échecs techniques. Ce processus expérimental ne peut être remplacé par un protocole *in vitro*. Seul un protocole *in vivo* peut reproduire la complexité des mécanismes physiologiques (hémodynamiques et immunologiques en particulier) retrouvés lors de la transplantation hépatique chez l'homme. Le raffinement de cette étude a également été mis en avant, en hébergeant les animaux dans des locaux adaptés à proximité de leurs congénères permettant de les voir et de les sentir. De plus les traitements anesthésique et

analgésique ont été mis au point par des médecins anesthésistes réanimateurs dans le but de réduire au minimum la souffrance des animaux.

7708 Notre laboratoire s'intéresse à une maladie génétique qui prédispose les patients à différents types de cancers. Notre objectif est d'identifier les mécanismes à l'origine des cancers chez ces patients et, par extrapolation, à l'origine du développement de certains cancers dans la population générale. Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour de nouvelles pistes de traitements anti-cancéreux.

Notre équipe a publié plusieurs articles scientifiques internationaux montrant que 1) les cellules en culture dérivées de ces patients présentent une déficience pour une protéine impliquée dans le métabolisme de la synthèse d'ADN que j'appellerai dorénavant « protéine d'intérêt A » et 2) que cette déficience contribue à l'instabilité génétique des cellules des patients. Cette instabilité génétique est à l'origine de plusieurs anomalies qui affectent les cellules, comme le ralentissement de la vitesse de réplication de l'ADN, étape préliminaire à la division cellulaire. De plus, notre équipe a montré que l'expression de la « protéine d'intérêt A » est perdue dans près de 60% des cellules cancéreuses et des tissus tumoraux. L'ensemble de ces données suggère que les cellules déficientes pour « la protéine d'intérêt A » ont développé des mécanismes de tolérance à l'instabilité génétique, ce qui doit favoriser le développement de cancers car il est bien connu que l'instabilité génétique est associée à la cancérogénèse. Des travaux complémentaires nous ont permis d'identifier une seconde protéine, « la protéine d'intérêt B » qui permet aux cellules déficientes pour « la protéine d'intérêt A » de survivre et de proliférer malgré leur instabilité génétique. Nos résultats ont été validés dans plusieurs systèmes cellulaires. Maintenant que nous possédons toutes ces données dans des modèles cellulaires, nous souhaitons vérifier l'interaction entre les deux protéines d'intérêt *in vivo*. Seule une expérience dans un organisme vivant et complexe peut nous permettre d'y répondre. 24 souris seront intégrées dans cette étude. Elles recevront par injection sous-cutanée une lignée cellulaire tumorale déficiente ou non pour « la protéine B ». Le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par mesure de la tumeur à l'aide d'un pied à coulisse. Il s'agit d'une méthode non invasive et indolore pour l'animal.

Lorsque les tumeurs auront atteint un volume adéquat, les souris recevront par injection péri-tumorale une petite molécule qui va empêcher l'expression de la « protéine d'intérêt A ». Le but étant de vérifier chez la souris si :

1/ La déplétion de la « protéine d'intérêt A » dans les xénogreffes de cellules déficientes pour « la protéine d'intérêt B » accroît l'instabilité génétique de ces cellules,

Et 2/ La déplétion de la « protéine d'intérêt A » induit une augmentation du niveau d'expression de la « protéine d'intérêt B ».

Pour cette étude, le nombre d'animaux a été défini de façon à permettre l'obtention de résultats fiables avec le moins d'animaux possible. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux seront observés quotidiennement pour déceler d'éventuels signes de détresse ou de mal-être et des mesures adéquates seront prises pour arrêter immédiatement leur souffrance.

Leurs conditions d'hébergement sont optimisées pour limiter leur stress, avec par exemple, l'ajout d'éléments de raffinement comme des rondins de bois ou de coton dans les cages.

7709 Les maladies hépatiques constituent un problème majeur de santé publique. Cependant, même si les hépatites virales et la maladie hépatique alcoolique sont cruciales au niveau mondial, elles ne représentent pas la majorité des affections hépatiques. En effet, les pathologies hépatiques associées à l'obésité (NAFLD) représentent la première cause de maladie du foie dans les pays occidentaux. Les NAFLD regroupent différents stades d'atteintes hépatiques allant de la stéatose simple (accumulation de triglycérides dans le foie) à la stéatohépatite (NASH), la fibrose ou la cirrhose.

Si l'alimentation joue un rôle important dans le développement de cette maladie, la génétique est également impliquée rendant les individus plus ou moins susceptibles. Cette maladie hépatique a par ailleurs été associée à des changements de composition du microbiote intestinal et un rôle causal de ce microbiote dans le développement de ces atteintes hépatiques a été démontré chez la souris. Dans ce cadre, l'objectif de cette étude est d'évaluer les contributions respectives de la génétique et du

microbiote intestinal dans la susceptibilité au développement de la stéatose. Pour cela, nous utiliserons deux souches de souris : C57BL/6J (susceptible au développement de la stéatose) et A/J (résistante au développement de la stéatose). Ces souris recevront un régime riche en graisses et nous évaluerons le développement de la stéatose chez ces souris. Dans un deuxième temps, un traitement antibiotique (détruisant le microbiote intestinal) sera effectué chez ces deux souches de souris avant administration du régime riche en graisses, afin de déterminer si l'absence de microbiote affecte le développement de la stéatose. Enfin, le microbiote des souris C57BL/6J sera implanté chez des souris A/J traitées aux antibiotiques, et le microbiote des souris A/J sera implanté chez des souris C57BL/6J traitées aux antibiotiques. Cette étude permettra d'évaluer la contribution du microbiote intestinal dans la susceptibilité différente des deux souches de souris au développement de la stéatose. Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables. Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 104 souris sur 3 ans (4 groupes de C57BL/6 et 4 groupes de souris A/J et 8 donneurs de microbiotes). Chaque groupe sera composé de 12 souris ce qui est un minimum pour obtenir des résultats exploitables statistiquement. Les souris auront comme alimentation un régime spécial riche en lipides. Elles seront pesées de façon hebdomadaire. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose sur l'ensemble des animaux de ce protocole (mesure de la glycémie sanguine).

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de papier absorbant (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 3 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

7710 La septicémie, principale cause d'admission dans les unités de soins intensifs, est caractérisée par une réponse inflammatoire générale résultant d'une infection non contrôlée. En dépit de la mise en œuvre des directives internationales, des progrès médicaux constants et des milliards dépensés chaque année, la plupart des mécanismes impliqués dans la progression de cette infection sont encore aujourd'hui mal compris. Cependant, des données récentes ont permis d'émettre l'hypothèse qu'un blocage sélectif de la stimulation adrénérgique pouvait améliorer la survie des patients par l'intermédiaire d'une réponse cardiovasculaire mieux adaptée. Afin de confirmer ou infirmer cette hypothèse, nous souhaitons tester les effets de β 1-bloquants adrénérgiques chez des souris septiques. Pour cela, nous serons amenés à employer deux modèles de sepsis internationalement reconnus, le modèle par péritonite (CLP) et le modèle par administration de lipopolysaccharides (LPS). Les β 1- bloquants testés seront l'Aténolol et l'Esmolol et les souris seront réparties en 12 groupes (Contrôle, Contrôle-Aténolol, Contrôle-Esmolol, LPS, LPS-Aténolol, LPS-Esmolol, sham, sham-Aténolol, Sham-Esmolol, CLP, CLP-Aténolol, CLP-Esmolol). Ces recherches seront réalisées en suivant scrupuleusement la règle des 3R :

L'utilisation d'animaux, dans cette étude, est dictée par la complexité de cette pathologie touchant plusieurs organes simultanément. L'effet ne peut donc être considéré qu'à l'échelle d'un organisme. De plus, il existe une bonne corrélation entre les données obtenues chez les souris (en cas de synergie des résultats du modèle LPS et du modèle CLP) et l'homme au cours du sepsis. Pour limiter le nombre d'animaux, nous nous sommes appuyés sur les travaux antérieurs réalisés au sein du laboratoire, sur une analyse bibliographique poussée de cette pathologie et une optimisation des prélèvements (sang, cœur, aorte, artères, muscles) effectués après euthanasie sur chaque animal. Nous nous sommes également limités à l'utilisation de deux traitements potentiels (couramment employés chez l'homme), qui en cas de résultats positifs et complémentaires permettront d'envisager une étude clinique de phase II chez l'homme (réduction). Une attention particulière sera portée au bien-être animal à travers un suivi régulier des souris et ce afin de déceler tout excès de douleur, ce qui introduirait un biais dans nos recherches. Ce suivi a été planifié selon les critères définis dans le document ci-après et reconnu au niveau international (raffinement).

Au total, nous serons amenés à utiliser 360 souris pour cette étude.

7711 Ce projet consiste à immuniser des souris et des rats pour produire des anticorps spécifiques qui seront utilisés en recherche biomédicale. Les antigènes qui seront injectés aux animaux sont des protéines qui ont un lien avec le métabolisme de la sphingosine 1-phosphate (S1P). La S1P est un lipide biologique qui exerce des rôles physiologiques et physiopathologiques variés au niveau des systèmes cardiovasculaire, immunitaire et nerveux central. Un défaut dans la signalisation dépendante des récepteurs de la S1P peut conduire au développement de nombreuses conditions pathologiques comme le cancer, l'athérosclérose, ou la sclérose en plaque. La S1P et ses récepteurs sont également impliqués dans d'autres désordres tels que le sepsis, le diabète, l'asthme ou encore l'arthrite rhumatoïde. Compte tenu du profil d'expression différentiel des récepteurs de la S1P dans certaines conditions physiopathologiques, des thérapeutiques ciblées (agonistes et antagonistes) visant spécifiquement chaque récepteur de la S1P sont appelées à se développer dans un futur proche. Les récepteurs de la sphingosine 1-phosphate ainsi que les enzymes de biosynthèse de ce lipide sont autant de cibles pharmacologiques et la possibilité de les détecter de manière fiable et spécifique est alors absolument nécessaire. Ce projet nous permettra donc de produire des anticorps fiables (injection par voie sous-cutané des formulations antigéniques) qui seront utilisés dans le cadre de nos recherches sur les récepteurs du S1P et des enzymes de biosynthèse en tant que cibles pharmacologiques. Il sera réalisé en utilisant les compétences des zootechniciens qualifiés qui mettront en place les conditions d'hébergement et les méthodes les plus appropriées pour réduire toute angoisse, souffrance et dommages durables des animaux. Pour pallier au stress et à la douleur, les procédures expérimentales d'immunisation seront appliquées sous anesthésie locale et les animaux seront surveillés quotidiennement, et ces derniers seront sacrifiés si une souffrance ou une dégradation physique est constatée. Le nombre d'animaux nécessaires à la conduite de ce projet est estimé à 250 souris et 250 rats pour les 5 années.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Les produits d'origines animales sont utilisés uniquement parce que les produits fabriqués *in vivo* ou *in vitro* ne sont pas disponibles et/ou efficaces.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés au total est calculé au plus juste de façon à répondre aux exigences réglementaires et aux besoins quantitatifs de sérum pour les tests réalisés sur la période considérée.

Raffinement :

Les animaux sont hébergés dans des cages contenant des enrichissements, dans des locaux appropriés et conformes aux standards réglementaires, et suivis par un personnel spécifiquement formé.

En cas de signes cliniques, dans les meilleurs délais, les animaux bénéficient des soins vétérinaires ou sont euthanasiés selon les méthodes recommandées.

7712 Dans un contexte économique (volatilité des prix des aliments), environnemental (changements climatiques) et sociétal (demande pour une agriculture raisonnée) en pleine évolution, les élevages de ruminants sont amenés à réduire l'utilisation d'aliment concentré et à valoriser au maximum les ressources alimentaires dont ils disposent (fourrages et pâturages). Cependant, ces ressources, sensibles aux aléas climatiques, peuvent avoir une disponibilité et une qualité moindres et plus fluctuantes dans le temps. Dans ce contexte, disposer d'animaux capables d'utiliser le plus efficacement possible leur alimentation tout en maintenant leur production devient un enjeu clef des systèmes d'élevages laitiers. L'efficacité alimentaire peut-être décomposée en deux grandes capacités : celle à ingérer la juste quantité d'aliments et de nutriments nécessaire pour vivre, produire et se reproduire, et celle à constituer puis mobiliser des réserves lipidiques pour faire face à des variations de disponibilité et/ou de qualité d'aliment (dynamique des réserves corporelles). Pour ces

deux composantes, on observe de grandes différences entre les individus sans connaître les mécanismes qui les expliquent.

A travers ce projet nous cherchons à répondre aux questions suivantes :

- Les différences d'efficacité alimentaire entre individus sont-elles dépendantes du numéro de lactation et/ou de la densité énergétique de la ration disponible ?
- Existe-t-il un lien entre aptitude génétique à la persistance laitière et efficacité alimentaire ?
- Existe-t-il un lien entre efficacité alimentaire et aptitude à la reproduction ?
- Quels sont les composantes du déterminisme génétique de la capacité à mobiliser/reconstituer les réserves corporelles ?

Il s'agit ici de répondre à une problématique des filières de ruminants laitiers. Le projet nécessite donc d'utiliser des animaux ruminants vivants placés dans des conditions classiques d'élevage, sans remplacement possible par des modèles murins ou des approches *in vitro*. Il reposera sur des brebis laitières de race Lacaune. Pour répondre aux questions posées il sera nécessaire de mesurer les quantités d'aliments ingérées par les animaux, ainsi que des marqueurs sanguins du métabolisme. Les manipulations spécifiques au protocole seront réalisées sur un nombre restreint d'animaux (n= 96), lors de leurs 3 premières lactations. Elles consisteront en un contrôle en lot ou individuel des quantités d'aliments ingérées en période de bergerie durant 1 mois avant mise-bas et 70 jours pendant la lactation, et à 10 prélèvements sanguins au cours d'une année de production. Aucun effet indésirable de ce contrôle d'ingestion (sans contention, ni isolement) ou de ces prises de sang n'est attendu. En troisième lactation, ces animaux recevront pendant 30 jours une ration couvrant 80% des besoins en énergie, mimant ainsi une situation classique en élevage lorsque par exemple les fourrages sont de mauvaise qualité. Le contrôle d'ingestion sera prolongé pendant cette période et 4 prises de sang supplémentaires seront réalisées. L'effectif de ce premier groupe d'animaux a été raisonné pour explorer la variabilité interindividuelle et obtenir des réponses statistiquement significatives sur la relation entre aptitude à la persistance laitière et efficacité alimentaire. Pour l'analyse du déterminisme génétique de la dynamique des réserves corporelles et sa relation avec l'aptitude à la reproduction, un protocole allégé de prises de sang (à 3 reprises aux moments physiologiques clefs du cycle de production et à 2 reprises en début de gestation) sera appliqué à un deuxième groupe de 344 brebis du troupeau, en lactation en même temps que le premier groupe, pendant les 3 années du projet afin de mesurer les marqueurs du métabolisme et de la gestation. Pour un sous-groupe de 60 de ces brebis, l'aptitude à la reproduction sera complétée par une détermination de leur état ovarien au jeune âge et d'un suivi de l'apparition de leur cyclicité demandant au total 21 prises de sang pour des dosages hormonaux.

Les conditions de conduite des brebis sont similaires à celles habituelles en élevage ovin laitier Lacaune : en bergerie l'hiver puis au pâturage dès le printemps. Les procédures expérimentales sont légères et limitées dans le temps. Aucun effet indésirable n'est attendu pendant l'essai. Néanmoins l'observation d'une perte de poids >15% entrainera le retrait de l'animal. Tout animal malade sera retiré de l'essai et soigné. Pour limiter le stress de contention, les prélèvements seront réalisés par du personnel formé, avec un matériel adapté aux ovins auquel les animaux sont habitués. Les brebis seront habituées à utiliser les portillons avant le début de l'essai. Au terme de l'expérience, les animaux seront conservés en vie et replacés dans le cycle normal d'un l'élevage classique. Les attentes de ce projet sont, d'une part une meilleure connaissance des mécanismes biologiques liés à l'efficacité alimentaire des ruminants laitiers au cours de leur carrière, et d'autre part des premiers éléments sur le déterminisme génétique de ce caractère. Les résultats devraient permettre à plus long terme d'élaborer des stratégies de sélection génétique d'animaux mieux adaptés à l'utilisation de ressources fourragères. Le projet durera 3 ans et utilisera 440 animaux.

7713 L'immunothérapie par anti-checkpoints n'est pas suffisante pour induire des réponses anti-tumorales et traiter la totalité des patients. D'autres voies de signalisation de l'immunité innée induite jouent un rôle critique dans l'induction des réponses anti-tumorales. Une compréhension des mécanismes immunitaires impliqués est nécessaire. Dans ce projet, nous identifierons par quels mécanismes la stimulation d'une voie récemment identifiée induit une réponse anti-tumorale efficace, et comment elle agit en synergie avec les anti-checkpoints pour détruire les tumeurs.

Ce projet découle de résultats obtenus *in vitro* à l'aide notamment de lignées cellulaires en culture. Ces traitements doivent être évalués dans un système plus physiologique représentant un organisme vivant intégré tel que la souris. Cette étape de développement préclinique est indispensable pour tester l'efficacité, le mécanisme d'action ainsi que la toxicité éventuellement associée à ce type de traitement afin de pouvoir envisager d'appliquer cette thérapie en clinique chez l'homme. La souris est une espèce de choix pour les expériences menées en thérapeutique du cancer et elle a depuis longtemps servi à l'étude de thérapies anti-tumorales, notamment car la physiologie de la souris est proche de celle de l'Homme.

Nous prévoyons d'utiliser environ 936 souris pour une utilisation dans des procédures expérimentales, dont 126 souris génétiquement modifiées obtenues via le maintien de lignée déjà en utilisation. Selon les procédures, le nombre de souris par groupe est de 6 à 8 afin que les résultats obtenus puissent présenter une puissance statistique suffisante (ANOVA).

En accord avec les recommandations internationales en matière de cancérologie, toutes les mesures seront prises pour éviter le stress et la douleur des animaux grâce à un suivi clinique renforcé et le respect de points-limites.

7714 Dans le cadre de l'activité hospitalière, les médecins cardiologues sont amenés à réaliser la pose de prothèse valvulaire cardiaque afin de palier la déficience de fonctionnement d'une valve auriculo-ventriculaire lors d'insuffisance cardiaque chez l'homme.

Ce projet consiste à mettre en œuvre une formation pour les médecins cardiologues afin de leur permettre de s'entraîner sur un modèle animal, la brebis, dont la taille du cœur est voisine de celle d'un homme de corpulence moyenne.

Sur un animal anesthésié, les mêmes actes que ceux réalisés pour l'implantation d'une prothèse valvulaire (implant identique) chez l'homme seront réalisés.

Dans le cadre de ce projet de formations pour une durée totale de 5 ans, nous estimons avoir besoin au maximum de 12 brebis par an, soit 60 brebis sur 5 ans.

L'application de la règle des 3R au cours de ce projet sera effectuée de la façon suivante :

1) Réduction :

- Le nombre minimum d'animaux est choisi en tenant compte du nombre maximum de formations envisageables pour une durée de 5 ans. Un maximum de 12 brebis est envisagé par an. Aucun test statistique ne sera réalisé dans ce projet étant donné qu'il s'agit ici de formation à des gestes techniques.

2) Raffinement :

Au cours de ce projet, en matière de bien-être animal nous serons vigilant sur :

- une période d'acclimatation d'au minimum 5 à 7 jours au sein de l'animalerie avant leur utilisation
- de bonnes conditions d'hébergement (alimentation, boisson, soins)
- un suivi régulier des animaux (observations quotidiennes, analyse du comportement)
- la définition de points limites
- la mise en place de mesures adaptées (anesthésie et analgésie) pendant la formation pratique

3) Remplacement :

Pour permettre une mise en situation pratique des cardiologues, il n'est pas possible de remplacer l'utilisation de l'animal. Toutefois la séance pratique sera précédée par une séance de présentations théoriques avec des explications précises sur les bonnes pratiques afin d'améliorer l'efficacité de la séance pratique sur l'animal.

7715 Avec plus de 50 000 cas par an en France, la chirurgie colorectale est une chirurgie réalisée quotidiennement dans la plupart des centres hospitaliers publics ou privés. Elle reste grevée en postopératoire d'une morbidité importante et sa mortalité n'est pas nulle. La complication spécifique la plus grave et pourvoyeuse de cette morbi-mortalité est la mauvaise cicatrisation des anastomoses

(fistule anastomotique). Afin de diminuer la gravité de cette complication, on met en place régulièrement une stomie provisoire de protection (iléostomie ou colostomie). Outre les conséquences psychologiques pour le patient, ces stomies sont elles aussi grevées d'une morbidité spécifique et surtout nécessitent une nouvelle intervention chirurgicale pour la remise en continuité du circuit digestif. Un dispositif de dérivation interne a été breveté dans le but de remplacer les stomies de protection. Le dispositif est un stent entéral couvert, relié à son extrémité distale à une longue gaine souple, pour réaliser un by-pass intra colique provisoire.

Le but de ce travail est d'évaluer la sécurité et l'efficacité de ce dispositif avec une attention particulière sur le mode de migration spontanée du stent par les voies naturelles. Le modèle porcin a été choisi en raison de sa grande taille et de sa proximité anatomique avec l'homme.

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

- Le modèle animal a été réservé à la validation définitive du dispositif, de nombreux tests ayant été réalisés sur banc d'essai. Le modèle animal de grande taille permet, dans des conditions proches de la pratique humaine, de valider ces essais avant l'utilisation chez l'homme (exigence ANSM).
- Il s'agit de procédures chirurgicales standard pour lesquelles une anesthésie et une analgésie (per et postopératoire) adaptées sont utilisées. La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion.).
- Les animaux seront opérés par groupes de deux sans groupe témoin pour minimiser leur nombre
- Le nombre total d'animaux est de 12 qui devraient permettre de tester les éventuelles modifications des stents nécessaires à un temps de migration adapté.

7716 Chez l'homme, l'hyperactivité détrusorienne est définie par l'International Continence Society comme étant « la constatation urodynamique de contractions détrusoriennes involontaires pendant la phase de remplissage vésical, qui peuvent être spontanées ou provoquées ». On distingue deux types d'hyperactivité détrusorienne selon le facteur étiopathogénique en cause (1) idiopathique (aucune cause définie) ou (2) neurogène (cause neurologique identifiée, comme par exemple un traumatisme médullaire). La prise en charge médicale des patients est financièrement très lourde, notamment suite aux complications urologiques, modifications urodynamiques ou insuffisance rénale chronique. Ces complications sont les premières causes de ré-hospitalisation et affectent la qualité de vie et la morbidité des patients. Ainsi, ce syndrome est un réel problème de santé publique. Le bon fonctionnement du bas appareil urinaire impose l'intégrité du système nerveux central et périphérique, somatique et neurovégétatif. C'est à cette seule condition que la motricité vésico-sphinctérienne peut assurer l'alternance des phases de remplissage (continence) et de vidange (miction), par des phénomènes d'activation/désactivation de fibres musculaires. Malgré les avancées médicales et chirurgicales, les traitements actuels pour cette pathologie sont limités. Les antimuscariniques sont le traitement de première intention. Cependant, l'efficacité de cette prise en charge est limitée et les effets secondaires des antimuscariniques peuvent altérer l'observance du traitement. En deuxième intention, l'injection intradétrusorienne de toxine botulique A peut être proposée. Toutefois, son efficacité à long terme n'est pas connue et le caractère invasif de sa délivrance est certain.

Il est donc nécessaire de conduire une recherche visant à la réalisation de tests précliniques sur un modèle animal fiable, pour permettre le développement de traitements pharmacologiques innovants, tout en optimisant leur efficacité et en limitant leurs effets secondaires.

Il n'existe à ce jour aucun modèle *in vitro* permettant l'étude de cette pathologie (remplacement) définie par des symptômes et donc difficile à appréhender hors d'une situation physiologique. Dans ce contexte, des modèles précliniques d'hyperactivité vésicale ont été développés, notamment des modèles aigus basés sur une irritation de la vessie par un agent chimique. Le modèle aigu le plus utilisé est l'instillation d'acide acétique dilué conduisant à l'apparition d'une hyperactivité du détrusor. Ce modèle est particulièrement utilisé pour tester la réponse de candidats médicaments. Les études pharmacologiques menées sur ce modèle conduiront à l'utilisation d'environ 960 rats femelles sur 5 ans. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum nécessaire (réduction) pour réaliser des statistiques acceptables (12 rats par groupe de traitement), du fait des connaissances et de

l'expérience du personnel participant au projet et des procédures liées. Les rats sont hébergés par 2 animaux par cage, afin de favoriser leur interaction sociale et réduire leur stress et un enrichissement de la litière est mis en place de façon systématique (raffinement). Enfin, un suivi quotidien de l'état général et du poids des animaux sera réalisé, pour une action rapide en cas d'état de souffrance.

7717 L'hématopoïèse est le processus de production de l'ensemble des cellules immunitaires. Ce processus a lieu principalement dans la moelle osseuse chez le mammifère adulte à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

Or, la présence de CSH particulières a été récemment proposée dans d'autres tissus notamment le tissu adipeux, mais leur importance physiologique et physiopathologique reste à ce jour mal connue. Les études antérieures menées chez l'animal ont néanmoins montré que les CSH du tissu adipeux sont capables de générer dans ce tissu ainsi qu'à distance les cellules de l'immunité innée.

Ce projet consiste à étudier chez la souris le rôle physiopathologique des CSH du tissu adipeux et notamment leur capacité à générer des cellules immunitaires capables de participer à des réactions inflammatoires qui se produisent notamment lors du développement de maladies métaboliques (obésité/diabète). Nous comparerons cette activité à l'activité hématopoïétique médullaire classique. Pour suivre l'activité hématopoïétique de CSH *in vivo*, il est nécessaire de les injecter chez une souris préalablement irradiée ou ayant subi un traitement de chimiothérapie. La descendance des CSH est ensuite étudiée en conditions physiologiques ou pathologiques afin de déterminer

-dans quelles conditions les CSH sont capables de produire des cellules immunitaires

-quelles cellules immunitaires sont produites, dans quels organes elles sont localisées, et quelle est leur fonction.

Nous transplanterons donc des CSH isolées à partir de souris donneuses saines ou obèses/diabétiques, chez des souris receveuses elles-mêmes saines ou obèses/diabétiques, afin de déterminer comment l'obésité ou le diabète modifient l'activité hématopoïétique des CSH de tissu adipeux et de moelle osseuse.

Compte tenu de la variabilité de la reconstitution hématopoïétique, des différentes conditions physiopathologiques, nous avons prévu d'utiliser un maximum de 4344 souris sur 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux est indispensable. En effet, un certain nombre d'études ont déjà été réalisées *in vitro* et ont montré que les CSH du tissu adipeux sont multipotentes. Cependant, les cellules immunitaires produites à partir des CSH sont des cellules circulantes, qui interviennent dans de nombreux organes, et il est donc nécessaire de travailler chez l'animal pour étudier la physiopathologie intégrée de ces cellules.

Réduction : Les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique (test de Mann et Whitney). Les études antérieures effectuées nous ont permis de d'optimiser l'utilisation de ces modèles murins, permettant de ce fait d'en réduire le nombre. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons sont extraits de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures, sur l'état de santé global des animaux. De plus les protocoles sont réfléchis afin d'être le moins douloureux possible pour l'animal (mode et volume d'injection, durée du traitement...) et les études antérieures nous ont permis de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux. Les différentes procédures décrites dans ce projet ont déjà obtenu l'accord d'un comité d'éthique pour l'expérimentation animale.

7718 La résistance aux agents anti-cancéreux comme le 5-Fluorouracile (5-FU) et la Gemcitabine peut avoir pour origine des cellules particulières du système immunitaire, les cellules myéloïdes immunosuppressives (MDSC). Bien que ces agents thérapeutiques aient la capacité de tuer des MDSC, les MDSC survivantes traitées au 5-FU ou à la gemcitabine vont soutenir l'apparition d'une résistance et la progression tumorale par l'expression de cytokines pro-inflammatoires. L'objectif de cette étude est d'évaluer le rôle des acides gras oméga-3 docosahexaénoïque (DHA) et

eicosapentaénoïque (EPA) dans le contrôle de l'activation des MDSC dans le cas d'un traitement par 5-FU ou gemcitabine. A partir d'un modèle de transplantation de cellules cancéreuses murines EL4 et LLC chez les souris C57bl/6, nous évaluerons :

- l'effet d'EPA et de DHA sur la résistance acquise au 5-FU et à la gemcitabine
- le rôle des MDSC dans l'effet de l'EPA et du DHA et les mécanismes moléculaires impliqués.

Le modèle murin proposé permettra d'analyser les interactions entre les cellules cancéreuses et les différentes composantes du système immunitaire empêchant le remplacement des souris par des modèles *in vitro*.

L'utilisation des modèles de greffes de cellules cancéreuses murines permettra d'assurer l'homogénéité de la prise tumorale et de réduire ainsi le nombre de souris utilisées. Les souris avec les différentes tumeurs seront alors traitées par les acides gras et/ou les agents anti-cancéreux et la progression tumorale sera analysée. Pour obtenir une puissance statistique suffisante par un test ANOVA entre les groupes, et en raison de la variabilité de la pousse tumorale, nous avons déterminé que 15 souris par groupe seraient nécessaires ; cette estimation de 15 animaux par lot a été confirmée sur ce site <http://www.biomath.info/power/ttest.htm>. ; 15 souris réparties en 3 groupes de 5 souris. Le nombre de souris est de 120 réparties entre 8 groupes de traitements.

Pour répondre au volet raffinement, les souris soumises à la procédure expérimentale de transplantation de cellules cancéreuses seront maintenues en groupe pour favoriser la socialisation et placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu permettant la construction de nid. De plus, les souris porteuses de tumeurs seront surveillées quotidiennement et mises à mort avant l'apparition de souffrance.

7719 La démangeaison (sensation désagréable donnant envie de se gratter) est un symptôme courant de nombreuses maladies cutanées qui a un impact négatif sur la qualité de vie. La plupart des cas de démangeaison chronique sont mal traités par les antihistaminiques, et une meilleure compréhension des mécanismes sous-jacents de la démangeaison est nécessaire pour développer des traitements fondés sur des données probantes plus efficaces. Nous nous intéressons à une molécule qui aurait un rôle dans la douleur, l'inflammation et la régulation immunitaire. Elle est surexprimée dans les cellules de la peau dans un certain nombre de maladie inflammatoire de la peau notamment dans la dermatite séborrhéique et le psoriasis. Ceci suggère qu'elle pourrait être impliquée dans les conditions chroniques de démangeaison. De plus, les souris modifiées génétiquement qui n'expriment pas cette molécule développent un trouble cutané similaire à la dermatite atopique. Notre objectif est d'étudier la voie par laquelle la molécule entraîne des démangeaisons. Les méthodes alternatives ne nous permettent pas de discriminer l'effet douloureux de la démangeaison. L'utilisation du modèle animal est donc indispensable dans ce projet. Pour cela, nous utiliserons des souris modifiées génétiquement auxquelles nous administrerons la molécule. Afin de déterminer si l'administration de la molécule entraîne des démangeaisons, le comportement des souris après l'administration sera observé pendant 30 min. L'administration de substances sera faite dans la joue des souris. Ce site d'injection permet de discriminer les stimuli douloureux de ceux qui provoquent des démangeaisons. En effet, le comportement des souris est différent en réponse à ces deux types de stimuli (frottement avec les pattes avant en cas de douleur et grattement avec les pattes arrières en réponse à la démangeaison).

Pour optimiser l'utilisation et la protection des animaux au cours de l'expérimentation dans notre laboratoire, nous répondons à la règle des 3R dans ses différents aspects :

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé a priori en respectant les critères pour une analyse statistique appropriée. Les rongeurs utilisés sont consanguins et de même âge réduisant la variabilité entre les animaux et donc le nombre nécessaire pour obtenir des résultats fiables.
- Le bien-être de l'animal, outre les considérations éthiques, est aussi un facteur de variabilité expérimentale, qui est pris en compte et réduit grâce au suivi rapproché quotidien des animaux, l'enrichissement de leur environnement (coton ou sopalin afin qu'ils puissent faire un nid) et le respect de l'aspect social du groupe (pas d'isolement ni de changement de cage). De plus une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée avant l'expérimentation.

- Remplacement : Une grande partie du projet scientifique, non-présenté ici, utilise des procédures alternatives. En effet, notre laboratoire a une expérience reconnue dans les modèles *in vitro*, permettant de s'affranchir de l'utilisation d'animaux.

Le nombre de souris nécessaire pour conduire ce projet est de 300 souris à raison de 30 lots comprenant 10 souris par lot.

7720 D'après l'OMS, les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. On comptait effectivement en 2012, 8.2 millions de décès liés à la maladie. Le cancer colorectal est le second cancer, pour ce qui est de la fréquence, chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième chez l'homme (après le cancer du poumon et celui de la prostate). Les cancers coliques ont une fréquence élevée en France : chaque jour, 100 personnes apprennent qu'elles ont un cancer colorectal. Plus exactement, on découvre 33 000 nouveaux cas par an, et 16 000 personnes en meurent. Chez les non-fumeurs, ils sont la deuxième cause de mortalité par cancer.

A ce jour, il existe plusieurs types de traitements contre ces deux types de cancers reposant le plus souvent sur la chimiothérapie, l'immunothérapie ou la radiothérapie. Cependant, ces traitements ne permettent pas une rémission de ces cancers dans 100% des cas. Pour l'ensemble des cancers colorectaux, tous stades confondus, le taux de survie après 5 ans est de 57 %. Mais ce taux est très variable selon le stade du cancer au moment du diagnostic.

Il est donc important de développer de nouvelle génération de traitement anti-cancéreux. Ce projet a donc pour objectif d'évaluer l'efficacité de nouveaux traitements anti-tumoraux innovants, à base de cellules lymphocytaires humaines reprogrammées pour aller tuer les cellules tumorales appelées CART.

Dans un premier temps, la croissance d'un modèle de tumeur colique implantée en orthotopique chez la souris sera caractérisée afin de tester dans un second temps l'efficacité de différents produits CART anti-tumoraux.

Afin de répondre à l'objectif de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable un cancer car ces derniers peuvent toucher de nombreuses cellules et organes différents et présentent de nombreuses interactions cellulaires et humorales.

L'efficacité de ces nouveaux traitements anti-tumoraux sera testée sur un modèle murin immunodéprimé à la fois pour permettre une pousse tumorale et également pour empêcher toute réaction de rejet du traitement administré (traitement à base de cellule humaine). Les cellules cancéreuses pourront être suivies par imagerie de bioluminescence au cours du temps. Cette méthode apporte plusieurs avantages. C'est une technique non invasive qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés tout au long de l'étude (R de Réduire). Cette technique permettra également de visualiser le développement des cellules cancéreuses dans l'organisme (impossible à visualiser à l'œil nu) et donc de déterminer des points limites plus prédictifs (R de Raffiner).

Lors de ce projet, 5 études de caractérisation de la croissance tumorale d'une tumeur colique orthotopique sera réalisée, comportant 13 souris par étude (soit 65 souris).

5 études d'évaluation de l'efficacité de différents traitements anti-tumoraux seront également réalisées. Pour chacune de ces études, 41 animaux seront nécessaires soit un total de 205 souris pourront être utilisés.

De ce fait, un maximum de 270 souris sera utilisé pour l'ensemble du projet.

La souche de souris utilisée étant immunodéprimée, une attention toute particulière sera portée à l'hébergement et aux soins de ces animaux afin d'éviter toute infection. Au cours de chaque étude, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter rapidement les premiers signes anormaux et ainsi prendre les mesures nécessaires pour le bien-être de l'animal. Une pesée deux fois par semaine au minimum (mais pouvant être plus fréquente en fonction de l'état clinique des animaux) sera également réalisée tout au long de l'étude après injection des cellules tumorales. Toute anomalie clinique observée sera rapporté à un vétérinaire dans le but de réaliser un examen clinique

plus approfondi. Des mesures thérapeutiques seront mises en place pour essayer de traiter les animaux en fonction des signes cliniques observés sans interférence avec les produits testés (injection de fluides, d'analgésiques, isolement, réchauffement, etc.)

7721 L'hypertension pulmonaire est une maladie progressive grave qui touche les petits vaisseaux sanguins des poumons et dont le symptôme principal est l'essoufflement à l'effort. Ces vaisseaux transportent le sang à partir du cœur vers les poumons, où il se charge en oxygène (O₂) pour alimenter tout l'organisme. Il est estimé de 15 à 25 cas pour un million d'habitants et le pic de fréquence se situe entre 30 et 40 ans. L'évolution naturelle de cette maladie varie fortement d'un individu à l'autre, mais elle conduit à une insuffisance cardiaque droite responsable du décès du patient seulement quelques années après la déclaration de la maladie. De nombreux médicaments permettent de réduire les symptômes de l'hypertension pulmonaire, cependant aucuns permettent à ce jour un traitement complet de la maladie. Lorsque l'hypertension pulmonaire menace la vie du patient, ces patients peuvent subir une greffe cœur-poumon. Ainsi, la découverte de nouveaux médicaments apparait primordiale afin de lutter ou diminuer le développement de cette maladie. Avant de tester ces molécules thérapeutiques chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire, il est crucial d'appréhender au préalable la posologie et l'efficacité de ces molécules sur un modèle animal. Toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques. Les fonctions cardiovasculaires seront étudiées par des méthodes non invasives permettant de limiter le nombre d'animaux utilisés. Les animaux sont mis à mort en fin d'expérimentation et les tissus prélevés sont partagés afin de minimiser encore le nombre d'animaux utilisés. Des expériences de biochimie et de biologie moléculaire à partir des différents tissus collectés et des études sur cellules isolées seront effectuées dans la mesure du possible afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ainsi, toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter le principe des 3 R (Réduction, Raffinement, Remplacement). De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress. Le nombre total de rats utilisés sera de 300 sur l'ensemble de l'étude en combinant plusieurs approches expérimentales par différents expérimentateurs sur le même animal. A l'heure actuelle les mécanismes responsables du développement de l'hypertension artérielle pulmonaire sont mal connus c'est pourquoi nous allons utiliser pour ce projet un modèle unique au monde de rat génétiquement modifié pour un gène retrouvé muté chez les patients atteints d'hypertension pulmonaire afin d'étudier les mécanismes mis en jeu par ces mutations.

7722 La demande sociale du maintien de la santé le plus longtemps possible et la nécessaire stabilisation des dépenses de santé conduisent à considérer l'alimentation dans la réduction des risques de survenue des maladies dégénératives liées à l'âge comme incontournable. Ce concept du « potentiel santé » de l'alimentation est particulièrement pertinent pour la gestion de la physiologie ostéoarticulaire.

La polyarthrite rhumatoïde est une maladie dégénérative inflammatoire chronique qui est caractérisée par une atteinte articulaire souvent bilatérale et symétrique, évoluant par poussées vers la déformation et la destruction des articulations atteintes. Il s'agit du plus fréquent des rhumatismes inflammatoires de l'adulte avec une prévalence de 0.4% en France. De manière intéressante, cette pathologie possède certaines similitudes avec une autre pathologie, la maladie cœliaque, notamment de par le caractère auto-immun des deux pathologie et l'existence d'altérations comparables, dans les deux cas, de certains mécanismes de l'immunité. La maladie cœliaque se définit comme une intolérance permanente à différentes fractions protéiques du gluten contenues dans différents types de céréales telles que le blé, l'orge, le seigle et le triticale, ce qui conduit à une malabsorption de certains nutriments et des carences alimentaires. Les parallèles existants entre les deux pathologies, associés à l'observation par les rhumatologues d'une proportion importante, au sein des patients atteints de polyarthrite rhumatoïde, de personnes identifiant le gluten alimentaire comme facteur aggravant de leur symptôme, nous ont amené à étudier l'impact potentiel du gluten alimentaire sur le développement de la polyarthrite rhumatoïde.

Ce travail devrait notamment permettre d'évaluer objectivement la relevance du régime sans gluten pour les personnes souffrant de polyarthrite rhumatoïde. Le volet *in vivo* de ce projet sera conduit sur

un modèle de polyarthrite induite par injection de collagène de type II bovin chez le rat mâle Sprague-Dawley. Ce modèle d'étude permet d'appréhender le développement de la pathologie arthritique et sa potentielle modulation par l'alimentation, ce qui n'est possible que sur un organisme vivant pris dans sa globalité. Le nombre d'animaux (n=84) a été déterminé sur la base de la bibliographie et d'une puissance statistique nécessaire à la validation du modèle. Tout au long de l'expérimentation (qui durera deux mois de la réception des animaux à leur mise à mort), une surveillance sera mise en place pour détecter, réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux.

7723 L'insuffisance cardiaque est fréquemment la conséquence d'une ischémie cardiaque comme l'infarctus du myocarde. C'est une maladie fréquente (touchant environ 500 000 personnes en France) et de mauvais pronostic malgré les progrès réalisés ces dernières années dans son diagnostic et sa prise en charge. En effet si les thérapeutiques disponibles améliorent les symptômes et diminuent la morbidité associée, elles n'ont pas d'impact réel sur l'aggravation inéluctable de la maladie. L'insuffisance cardiaque se caractérise par la mort des cellules contractiles du cœur (cardiomyocytes) et par l'incapacité des cardiomyocytes survivants à remplacer le tissu lésé. Stimuler la prolifération des cardiomyocytes pourrait permettre de régénérer le cœur. Dans ce contexte, nous avons identifié une cible thérapeutique potentielle, la protéine : éphrine-B1.

Ephrine-B1 est une protéine de la membrane latérale de la cellule contractile du cœur (cardiomyocyte). Cette protéine se comporte comme un élément clé de la cohésion du tissu cardiaque mais aussi comme un inhibiteur naturel endogène de la prolifération des cardiomyocytes adultes. En effet, nous avons montré qu'en l'absence d'éphrine-B1 (souris génétiquement modifiées pour enlever éphrine-B1), les cardiomyocytes présentent une capacité de prolifération significative à la fois *in vitro* (cardiomyocytes isolés) mais également *in vivo* dans un modèle d'apectomie (suppression chirurgicale partielle de l'apex la pointe du cœur). Ces données suggèrent qu'éphrine-B1 pourrait potentiellement constituer une cible d'intérêt thérapeutique en régénération cardiaque. Néanmoins, pour confirmer ce potentiel thérapeutique, il est maintenant nécessaire de démontrer le potentiel de régénération cardiaque en l'absence d'éphrine-B1 dans un modèle plus pertinent que l'apectomie pour l'Homme : l'infarctus du myocarde. Afin d'induire la délétion d'éphrine-B1, nous utiliserons une stratégie de thérapie génique basée sur l'utilisation d'un vecteur viral permettant une diminution de l'expression d'éphrine-B1, basée sur l'utilisation d'un virus à fort tropisme pour le cœur et modifié pour provoquer l'extinction de l'expression d'éphrine-B1. Cette stratégie pourrait être, le cas échéant, transposable à l'homme.

Cette étude nécessite l'utilisation de 80 souris. Compte-tenu du taux de mortalité lié à la chirurgie (induction de l'infarctus du myocarde par ligature d'une artère coronaire) et du critère de sélection (expliqué ci-après), deux cohortes de 20 souris analysables sont prévues : une cohorte contrôle et une cohorte ayant subi un infarctus du myocarde. Dans chaque cohorte, 10 souris recevront une injection rétro-orbitaire d'un vecteur viral contrôle et 10 souris recevront le vecteur viral permettant d'induire la délétion d'éphrine-B1.

Les infections/ injections virales seront réalisées 4 jours après l'installation de l'infarctus du myocarde chez des animaux dont la fonction cardiaque est diminuée (reflétée par une fraction d'éjection, paramètre mesuré en échocardiographie mesurant la force de contraction du cœur, inférieure à 45%).

L'analyse du potentiel de régénération cardiaque sera effectuée par 1/ un suivi fonctionnel en échocardiographie et 2/ à l'issue de l'expérience (3 mois), par des analyses tissulaires en microscopie.

La règle des 3R sera appliquée dans ce projet :

- Raffinement : l'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et des potentiels effets indésirables des procédures sur leur état de santé global ;

- Réduction : l'expérience a été organisée afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Compte tenu du taux de mortalité liée à l'ischémie cardiaque (50%) et à la chirurgie dans le groupe contrôle (environ 15%) et compte tenu du critère de sélection (fraction d'éjection inférieure à 45% pour injecter chez la cohorte infarctus du myocarde), le nombre total d'animaux utilisés au maximum dans ce projet sera de 80 ;

- Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de moyens alternatifs pour l'étude des capacités de régénération du tissu cardiaque et la mesure de l'impact de la stratégie expérimentale envisagée sur la fonction du cœur.

7724 Le syndrome de Rett est une maladie rare qui altère le développement du système nerveux central. Il se manifeste par une régression rapide des acquis après 6 à 18 mois de développement normal. Les malades ont une déficience intellectuelle sévère et présentent des complications multiples, dont des troubles respiratoires et cardiovasculaires. L'origine génétique de la maladie a été démontrée en 1999 par une équipe américaine qui a identifié la mutation d'un gène porté le chromosome sexuel X : le gène MECP2. La mutation du gène MECP2 concerne 95% des enfants touchés par le syndrome. Chez les 5% restants, la mutation est absente et l'origine de la maladie reste inconnue.

Depuis la découverte du gène MECP2, des recherches ont permis de comprendre son importance dans la maturation neuronale. Dans le syndrome de Rett, la mutation du gène rendrait la protéine inopérante et le système nerveux serait incapable de fonctionner normalement.

Une équipe de recherche est en train de développer un traitement qui pourrait permettre de diminuer les symptômes de cette maladie. L'étude se fera sur 40 souris déficientes en *Mecp2* : 4 groupes de 10 souris, exclusivement des femelles, 1 groupe mutant traité par la molécule en développement, 1 groupe mutant traité par le véhicule, 1 groupe contrôle traité par la molécule, et 1 groupe contrôle traité par le véhicule. Les animaux sont traités à 5 semaines au moment où les symptômes apparaissent, tous les jours pendant 3 mois (soit arrêt du traitement à 4 mois d'âges). Traitement par voie intra-péritonéale. Puis à partir de 14 semaines des tests comportementaux sont réalisés tel que le test d'enfouissement, le labyrinthe en croix, le test dit de l'Open Field (observation des déplacements dans une arène), de test de la piscine de Morris, puis les animaux sont sacrifiés pour pouvoir analyser les cerveaux.

Nous tendrons vers les objectifs préconisés de réduction de souris utilisés, de remplacement du modèle animal et du raffinement de la méthodologie utilisée de la manière suivante :

Remplacement : Cette approche est effectuée chez la souris, qui est l'espèce de mammifère pour laquelle l'approche génétique est la plus avancée. De plus, l'étude du comportement ne peut pas être réalisée *in vitro*.

(1) Le nombre d'animaux utilisé sera minimisé autant que possible grâce à l'étude de plusieurs paramètres chez le même animal. Le test statistique utilisé sera ANOVA. (2) Nous réduirons au maximum les techniques douloureuses ou stressantes. Les animaux seront logés dans les meilleures conditions possibles. Le raffinement sera respecté par une période d'adaptation à l'hébergement en zone de phénotypage. Chaque animal sera suivi tout au long de l'expérience afin de détecter tout indicateur de souffrance et déterminer si besoin l'arrêt de l'expérimentation et son euthanasie. (3) Ce projet de neurosciences implique une analyse comportementale déjà bien caractérisée chez la souris.

7725 Les plaquettes sanguines permettent l'arrêt du saignement lors d'une blessure et jouent un rôle important dans le développement de maladies cardiovasculaires (première cause de mortalité dans les pays industrialisés). Un moindre défaut de leur production ou de leur activation peut avoir des conséquences soit hémorragiques (activation diminuée) soit d'occlusion des vaisseaux (activation augmentée) amenant à des accidents vasculaires cérébraux ou des infarctus du myocarde.

L'obésité et le diabète de type 2 sont en constante augmentation depuis des années dans les pays industrialisés et s'accroissent avec le vieillissement de la population. Le risque de maladies cardiovasculaires, dû en particulier aux événements d'hyperactivation plaquettaire, a un poids considérable dans les complications associées à l'obésité et au diabète de type 2. Par ailleurs, ces patients ont des comptes et des volumes plaquettaires anormaux qui sont aussi des facteurs de prédisposition de maladies cardiovasculaires. Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'augmentation du risque plaquettaire chez les patients atteints d'obésité et de diabète de type 2 étant encore mal compris et les stratégies thérapeutiques étant limitées, il apparaît urgent (i) de comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans le dysfonctionnement de la production et de l'activation plaquettaire dans un contexte d'obésité et/ou de diabète de type 2 et (ii) de trouver de nouvelles cibles pharmacologiques ciblant les plaquettes afin de prévenir et de lutter contre les complications

plaquettaires chez les patients atteints d'obésité et/ou de diabète de type 2. Dans ce contexte, nous pensons, au vu de nos résultats récemment publiés, qu'invalider les enzymes du métabolisme de certains lipides pourrait avoir un intérêt thérapeutique dans la prévention des complications associées à l'obésité et au diabète de type 2. Pour ce faire, nous disposons de modèles de souris génétiquement modifiés car il n'existe pas à ce jour d'inhibiteurs spécifique de ces enzymes étant actif *in vivo*. Le nombre de souris estimé pour cette étude est de 288 animaux maximum sur 5 ans avec 8 procédures expérimentales. Les souris, devenant obèses et diabétiques après 12 semaines de régime hyperlipidique, seront hébergées par cages de 3 individus selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R). Les souris utilisées dans cette étude sont sous fond génétique C57Bl/6J, classiquement utilisée dans les études du métabolisme, dont les mâles répondent très bien au régime hyperlipidique. Les animaux seront observés tous les jours et pesés toutes les deux semaines sur une période de 12 à 16 semaines afin de repérer des anomalies, notamment en terme de comportement général, de poids ou d'apparence. En cas de blessure, les animaux seront soit séparés et leurs blessures traitées à la Bétadine pour favoriser une cicatrisation propre, soit euthanasiés (en fonction des blessures, sur avis du responsable du projet).

Le nombre d'animaux sera réduit au maximum (i) en suivant des protocoles expérimentaux établis et en tenant compte d'expériences déjà réalisées qui nous ont montré que nous pouvons obtenir des résultats statistiquement correct en faisant des groupes de 6 à 24 souris selon la procédure réalisée, (ii) en limitant aux seules expériences considérées comme absolument indispensables en fonction des résultats obtenus au fur à mesure du développement du projet et (iii) en évitant la répétition d'études antérieures. Toutes les procédures expérimentales se feront sous anesthésie/analgésie. La douleur et souffrance des animaux sera évité par une surveillance des animaux pendant le protocole expérimental et une euthanasie rapide si l'animal est en souffrance.

7726 Titre du projet : Canal calcique TRPV6 comme la cible thérapeutique contre le cancer de la prostate : utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la partie extracellulaire.

Contexte de la recherche :

TRPV6 est un canal très sélectif pour le calcium faisant parti de la famille TRP. Grâce à sa haute sélectivité pour le calcium par rapport aux autres canaux TRP, il a été montré que ce canal participe grandement à la régulation de l'homéostasie calcique dans le corps. TRPV6 intervient comme étant la première étape dans le mécanisme transcellulaire qui est impliqué dans beaucoup de processus tels que l'absorption de calcium dans l'intestin et la réabsorption dans le rein. Un vaste ensemble de preuves suggère que la surexpression de TRPV6 doit être un fait commun dans les cancers d'origine épithéliale. Lorsque l'on compare avec des tissus ou cellules normales, l'expression de ce canal est considérablement augmentée dans le tissu cancéreux prostatique, dans les carcinomes humains du côlon, du sein, de la thyroïde et des ovaires. Les niveaux d'expression de TRPV6 corrént positivement avec la progression de la tumeur et son agressivité comme indiqué par le stade pathologique et le score de Gleason des tumeurs de prostate. Il a été montré que TRPV6 est directement impliqué dans le contrôle de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques en augmentant les taux de prolifération et de survie. De plus, les patients atteints de cancer du sein présentant des hauts niveaux de TRPV6 ont une survie diminuée comparé aux patients avec une faible expression de TRPV6. La surexpression du canal TRPV6 a été associée avec un stade précoce de cancer du côlon, et l'inhibition de l'expression de TRPV6 inhibe la prolifération et induit l'apoptose dans les cellules cancéreuses de côlon. En dépit de la découverte de son rôle crucial dans la prolifération et la survie des cellules cancéreuses *in vitro*, aucun outil fiable ciblant le canal TRPV6 *in vivo* n'a été reporté à ce jour pour être utilisé comme thérapie efficace contre les cancers cités.

Résumé de la recherche :

Le principal but de cette étude est d'élaborer un outil efficace *in vivo* tel qu'un anticorps monoclonal spécifique avec un épitope extracellulaire capable de cibler et de supprimer les tumeurs surexprimant TRPV6. Trois objectifs spécifiques doivent être atteints afin d'accomplir le but principal.

1) Invalidation complète des isoformes potentielles *in vivo* en utilisant 4 séquences de siARNs valides *in vitro* dans le but de : (a) étudier si les domaines particuliers du canal TRPV6 sont exprimée et impliquées dans la cancérogénèse *in vivo*; (b) montrer les mécanismes potentiels impliqués dans le

ciblage sélectifs des isoformes du canal TRPV6 ; et (c) sélectionner les siRNA dirigés contre les parties traitées *in vivo* pour générer juger sur le rôle et le pronostic la cancérogénèse de la prostate en utilisant un modèle de xénotransgreffe de cancer dans des souris immunodéficientes.

2) Preuve du concept : ciblage *in vivo* de plusieurs lignées cellulaires de cancer de la prostate en utilisant l'anticorps monoclonal avec épitope extracellulaire en ayant un aperçu des possibles voies/mécanismes où l'inhibition/silencing du canal TRPV6 est impliquée.

3) Ciblage et suppression *in vivo* des tumeurs humaines issues de l'excision chirurgicale en utilisant un modèle de greffe de tissu tumoral chez des souris immunodéficientes.

Les souris swiss Nude qui sont couramment utilisées en oncologie, seront utilisées. Elles sont immunodéficientes, ce qui permet l'injection de cellules tumorales humaines. Toutes les manipulations avec des animaux respecteront la réglementation européenne, ainsi que la règle des 3R. Pour réduire le nombre d'animaux au maximum, 10 souris par groupe avec 6 groupes par protocole sera nécessaire pour réaliser un test statistique de Wilcoxon requis pour ce type d'étude. Les 3 protocoles expérimentaux seront employés en utilisant en total 180 souris. Pour raffiner les expériences, l'enrichissement sera mis dans la cage tel que des tunnels ce qui permettra de diminuer le stress chez l'animal ainsi que la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées, augmenter sa capacité à s'adapter à l'environnement. Lorsque le point limite de tumeur est atteint (tumeur >2000mm³, poids faible), l'animal sera sacrifié par injection de pentobarbital après anesthésie par isoflurane.

Enjeux en matière de cancérologie et de santé publique :

L'application la plus importante de ce projet sera l'anticorps monoclonal afin de cibler spécifiquement et de stopper les tumeurs humaines surexprimant TRPV6. La séquence de l'épitope sera brevetée pour le traitement du cancer de la prostate et les autres cancers. Comme l'implication de TRPV6 a déjà été démontrée dans de nombreux cancers humains, l'anticorps généré peut être testé dans de nombreux types de cancers pour élargir son utilisation thérapeutique. Pour finir, l'anticorps testé pourra être modifié et utilisé comme thérapie seule ou en combinaison contre différents cancers chez l'humain.

7727 De nombreuses avancées ont été faites dans le développement des thérapies ciblées sur les voies de signalisations cellulaires mais le taux de succès de ces nouveaux traitements lors des essais cliniques reste inférieur à 5%. La difficulté à valider ces nouvelles thérapies s'explique par l'absence de modèle préclinique en recherche oncologique. En effet, la plupart du temps, ces modèles précliniques utilisent des lignées cellulaires, leur nombre est limité et leur mise en culture pendant des années est probablement à l'origine de modifications génétiques expliquant leur manque de fiabilité. Les modèles *in vivo* de RCC ont été longtemps limités à des xénotransgreffes dérivant de ces lignées cellulaires et la plupart des études précliniques d'efficacité thérapeutique sont faites à partir de ces modèles, ne permettant pas de prédire des résultats oncologiques obtenus en recherche clinique. De plus, les lignées cellulaires les plus utilisées ne donnent généralement pas de développement métastatique, empêchant l'étude des carcinomes avancés, indication usuelle des nouveaux traitements systémiques.

Les greffes de tissu tumoral dérivant des patients et directement implantées chez la souris ont révélé une plus grande fiabilité pour prédire les réponses aux traitements systémiques. Ceci est probablement lié à la préservation des caractéristiques histo-pathologiques et moléculaires du cancer d'origine. Le recours aux animaux permet de reproduire un modèle oncologique proche de l'homme et de retrouver tout le microenvironnement tumoral permettant le développement des tumeurs et de se rapprocher au plus près des résultats qui pourront être observés par la suite en recherche clinique. L'utilisation des techniques de greffes de tissu tumoral permet donc une nouvelle modélisation préclinique indispensable à la découverte de médicaments plus efficaces et, à terme, curatif pour le RCC métastatique.

Sur la durée du projet, il est prévu de sélectionner 50 patients, dont la tumeur sera prélevée en vue d'une greffe chez la souris. Les patients seront choisis en fonction du stade et de l'agressivité tumorale. Pour chaque tumeur de patients prélevée, des souris seront greffées afin de ne sélectionner que les greffons positifs. En effet, l'hétérogénéité tumorale est bien connue la réussite de la greffe sur l'ensemble des souris n'est pas totale. Cela permettra de réduire le nombre d'animaux greffés

ultérieurement et de constituer des groupes homogènes pour l'évaluation de l'efficacité thérapeutique. Au final, ce projet utilisera 2750 souris sur 5 ans. Les lots d'animaux par tumeur et traitement envisagé étant de 10 souris, les tests statistiques utilisés seront des tests non-paramétriques utilisés classiquement en biologie expérimentale : Kruskal-Wallis et Wilcoxon.

Une fois les tumeurs rénales greffées sur les souris, celles-ci seront imagées par échographie (technique d'imagerie ultrasonore) et imagerie par résonance magnétique (IRM), qui présentent l'avantage d'évaluer de façon non-invasive la prise de greffe puis l'efficacité de nouveaux traitements par rapport aux thérapies existantes. Ces techniques sont parmi les plus raffinées et les moins invasives qu'il existe, permettant de suivre le développement tumoral et l'évolution de thérapies sans avoir à faire mal à l'animal (animal sous anesthésie générale). De plus, leur bien-être sera au cœur de notre préoccupation par l'utilisation d'enrichissement, le maintien en groupe de cet animal grégaire ou encore le maintien optimal de ces conditions d'environnement.

7728 1-Objectif scientifique du projet :

L'herpès-virus 6 humain (HHV-6) est présent sous forme latente chez plus de 90% de la population adulte. De nombreuses études cliniques ont associé ce virus à différentes maladies neurologiques telles que la sclérose en plaques (SEP) ou les encéphalites sévères chez des patients immunodéprimés. Cependant, l'immunopathogénèse de l'infection virale et la capacité d'HHV-6 à induire une neuroinflammation n'a pas encore été bien comprise. De plus, l'absence de modèle d'infection chez le petit animal a ralenti l'étude de la pathogénèse virale. Un modèle de souris transgéniques, qui expriment le récepteur cellulaire humain pour HHV-6A a récemment été développé. L'ADN du virus persiste dans le cerveau des souris transgéniques pendant plusieurs mois dans les cellules de la microglie mais également dans des neurones localisés dans des zones connues pour abriter des neurones sérotoninergiques, qui contrôlent de nombreux facteurs comportementaux ayant notamment une implication dans le sommeil, l'humeur, l'activité locomotrice ainsi que sur l'anxiété. De plus, des résultats montrent qu'HHV-6A induit une neuroinflammation provoquée par l'infiltration de cellules immunitaires dans le cerveau de souris infectées, suite à la détection du virus par la réponse immunitaire innée. L'utilisation de ce modèle de souris transgéniques est cruciale afin d'étudier *in vivo* l'impact de l'infection sur le comportement de la souris, notamment sur ses capacités locomotrices et sur son anxiété. Nous pourrions également évaluer l'impact de la prise en charge de l'infection virale, par l'immunité innée, sur le comportement grâce à différentes lignées de souris déficientes pour certains éléments de l'immunité innée.

2- Retombées attendues

Cette étude permettra de déterminer si la persistance du virus peut induire des changements comportementaux chez l'organisme hôte et évaluer l'impact de la réponse immunitaire innée sur ces potentiels changements de comportement. Les signes cliniques induits observés étant subtiles, il est crucial de mettre en place une étude comportementale fine, grâce à des tests adaptés, permettant d'obtenir des données qualitatives et quantitatives, analysables avec des tests statistiques, afin de mettre en évidence de potentielles différences significatives suite à la neuroinfection entre les animaux rendus susceptibles par l'expression du récepteur d'entrée du virus (exprimant ou non la totalité des variants du récepteur de l'immunité innée) et les témoins négatifs non susceptibles.

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

Une étude bibliographique a été réalisée au préalable pour éviter toute expérimentation animale redondante avec ce qui a déjà été publié. Le caractère novateur de notre projet et donc le peu de données disponibles, nous oblige à valider la technique avec de nombreux contrôles avant de pouvoir commencer les expérimentations avec le virus. Toutes les étapes du projet sont basées sur des études effectuées et validées auparavant par une méthode *in vitro*. Cependant, l'interaction entre le virus et l'intégralité du système immunitaire d'un individu est un événement beaucoup trop complexe pour être réduit à l'utilisation de lignées cellulaires et requiert l'utilisation du modèle animal.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

Sur une période de 5 ans, nous prévoyons l'utilisation de 200 souris. Les expériences sont organisées sur des groupes de 10 souris maximum. Le nombre de 10 souris par groupe est nécessaire pour l'interprétation statistique des résultats.

5- Soins des animaux

Le suivi clinique des animaux sera quotidien et les points limites ont été fixés de façon à mettre à mort l'animal dès l'installation des premiers signes de douleur.

7729 Il est maintenant largement admis qu'un cancer se développe lorsque les cellules cancéreuses échappent au contrôle du système immunitaire et que mobiliser les défenses immunitaires afin de réactiver les cellules T anti-tumorales endogènes est une option thérapeutique qui peut entraîner des réponses complètes et durables. Les stratégies qui sont actuellement en cours d'élaboration visent à inhiber les blocages des points de contrôle immunitaire (CTLA4, PD1, PDL1 anticorps neutralisants.) ou élargir le répertoire des lymphocytes T (vaccination, ingénierie des cellules T par l'intermédiaire des récepteurs d'antigènes chimériques.). Cependant, en dépit des résultats cliniques impressionnants de certaines de ces stratégies, la majorité des patients rechute après un traitement, ce qui souligne la nécessité d'approches combinées.

L'interféron de type I est bien connu pour son activité anti-tumorale puissante dans des modèles de tumeurs chez la souris. En outre, il a été montré être une cytokine clé nécessaire à l'efficacité de nombreux agents anti-cancéreux ciblant non seulement les cellules cancéreuses, mais aussi le système immunitaire. Cependant, en raison des effets secondaires ressentis par les patients, l'utilisation de l'interféron, seuls ou en combinaison, n'est plus pris en considération par le clinicien en raison des doses maximales tolérées trop faibles pour atteindre des efficacités thérapeutiques.

Récemment, une méthode de ciblage de l'activité de l'interféron a été développée et pourrait aider à reconsidérer l'usage de thérapie à base d'interféron de type I en clinique. En effet, ces nouvelles molécules d'interféron affichent une augmentation d'activité d'un facteur 1000 sur les cellules cibles et ainsi réduisent les effets secondaires dus à l'action de l'interféron sur les autres cellules.

Le présent projet a donc pour but d'évaluer *in vivo* dans 3 modèles de pathologies expérimentales chez la souris qui permettent de répondre à des questions biologiques différentes, l'efficacité de ces nouvelles molécules et leur mécanisme d'action.

Une attention toute particulière sera donnée à la réduction du nombre d'animaux par des études statistiques a priori. Les méthodologies utilisées prendront en compte le suivi des points limites pour interrompre l'expérimentation le plus tôt possible et minimiser douleur et détresse des animaux. Des technologies alternatives seront utilisées à chaque fois que la question scientifique posée sera compatible avec l'utilisation de modèles *in vitro*. A titre d'exemple, quand une nouvelle molécule d'interféron ciblé sera construite, son efficacité d'action sur les cellules exprimant la cible sera évaluée sur des lignées cellulaires *ad hoc* en mesurant les marqueurs d'une réponse IFN. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés quotidiennement.

La réalisation du projet nécessitera au maximum l'utilisation de 1980 souris sur 5 ans.

7730 Les cellules qu'on appelle progéniteurs sanguins de l'embryon diffèrent de ceux de l'adulte par plusieurs caractéristiques (marqueurs, capacité de migration, de reconstitution, etc.). Par exemple, les cellules souches hématopoïétiques (CSH) se multiplient activement chez l'embryon, mais très peu chez l'adulte. Il a été montré que la réactivation dans les CSH de l'adulte de gènes spécifiques des CSH de l'embryon, redonne aux CSH adulte les propriétés des CSH embryonnaires (capacité de reconstitution accrue), mais conduit aussi au développement de leucémies. Des données actuelles indiquent aussi que des leucémies peuvent résulter d'événements produits durant l'ontogenèse. Il est donc essentiel de mieux comprendre comment est régulé le développement du système sanguin de l'embryon. Nous cherchons donc à identifier des gènes qui régulent les propriétés des progéniteurs sanguins de l'embryon, par l'analyse de mutations qui perturbent ce développement. L'élucidation de ces questions constituerait une avancée vers la connaissance des mécanismes déclencheurs de leucémies.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour les raisons suivantes :

Le seul test fonctionnel pour caractériser la nature souche de cellules testées, est la capacité à reconstituer l'ensemble des cellules sanguines d'une souris irradiée après la greffe à un receveur

irradié. Compte tenu de l'importance thérapeutique de ces cellules souches, les études destinées à mieux connaître ces cellules rendent ce type de test *in vivo* incontournable.

L'utilisation de souris génétiquement modifiées pour étudier de façon précise l'ensemble des défauts liés à des mutations retrouvées dans des pathologies est incontournable.

Ceci est principalement dû au fait que nous étudions les conséquences de modifications génétiques au niveau hématopoïétique mais aussi dans d'autres parties de l'organisme, conséquences qui peuvent passer par des médiateurs de type humoral, cytokines, etc. qui ne sont mesurables et quantifiables en dynamique que dans un organisme vivant entier. De plus, les mutations peuvent affecter différemment les stades de développement embryonnaire.

Le bénéfice attendu par les travaux prévus dans ce projet est dans tous les cas une meilleure connaissance de la façon dont le système hématopoïétique se développe chez l'embryon, et comment ce développement est affecté par des mutations de facteurs de transcription connus pour être impliqués dans les leucémies pédiatriques. Sachant que le consensus actuel est qu'une grande partie de ces leucémies pédiatriques résulte d'événements qui ont lieu au cours du développement embryonnaire.

Pour effectuer ce projet, nous avons estimé un nombre nécessaire d'au maximum 650 souris.

Pour réduire le nombre de souris nécessaire à nos recherches :

1- nous pratiquons des expériences préliminaires *in vitro* pour évaluer si les mutants (embryons hétérozygotes et homozygotes) présentent une modification du compartiment des CSH par rapport aux embryons sauvages. Dans l'affirmative, nous devons pratiquer expériences *in vivo* pour mieux caractériser ce défaut. Si ces expériences *in vitro* ne montrent pas de différence entre les embryons hétérozygotes et sauvages, nous nous basons sur ces résultats pour justifier de ne pas entreprendre les expériences *in vivo* avec ce génotype, ce qui réduit d'un tiers le nombre d'animaux receveurs utilisés.

2- nos expériences faisant appel à des souris gestantes, elles cumulent un nombre important de petits lots. Les résultats pour chacun de ses lots sont analysés immédiatement et les expériences sont arrêtées dès que des résultats statistiquement significatifs sont obtenus.

3- Dans la mesure du possible :

- pour des expériences similaires, faisant appel à différents tissus d'embryons de même stade, nous planifions les expériences de façon à ce que les deux types d'analyse soient effectués le même jour, par deux étudiants, ce qui réduit de moitié le nombre de souris nécessaires.

- nous planifions des analyses d'embryons de différentes souches mutantes au même stade de gestation, de façon à mettre en commun le témoin sauvage pour les deux types d'études, ce qui réduit d'un tiers le nombre de souris nécessaires.

4- nous donnons à des collègues habilités à les recevoir, certains tissus hématopoïétiques embryonnaires (exemple le foie) des embryons où ce type d'organe n'a pas été utilisé.

Les souris seront maintenues en milieu enrichi et auront accès à du « Diet Gel » pour faciliter l'alimentation lorsqu'elles auront subi une irradiation. Lors de toutes les interventions, les souris sont anesthésiées (localement pour les injections et généralement pour les prélèvements). Elles sont observées quotidiennement après l'intervention, et traitées en cas de problème.

7731 *Escherichia coli* est une bactérie retrouvée dans le tractus digestif des mammifères. Certaines souches d'*E. coli* ont acquis des propriétés qui leur confèrent un pouvoir virulent et sont donc à l'origine d'infections intestinale ou extra-intestinale chez l'homme. A ce jour, la prise en charge des patients s'effectue par des traitements symptomatiques ainsi qu'une antibiothérapie quand cela est possible. Pour certains pathotypes tels que les *E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC), l'utilisation des antibiotiques est déconseillée car elle peut engendrer une production accrue de toxine par le pathogène et ainsi aggraver les symptômes de l'infection.

Dans le cadre d'un projet visant à caractériser de nouveaux facteurs de virulence des EHEC, et à développer de nouvelles approches thérapeutiques, des travaux récents ont identifié des gènes potentiellement impliqués dans le processus infectieux du pathogène. L'objectif est désormais de

valider leur implication *in vivo*. Pour ce faire, nous devons utiliser un modèle animal car la maladie provoquée par l'infection par cette bactérie provoque l'atteinte simultanée de plusieurs organes et ne peut pas être reproduite *in vitro* en utilisant un modèle animal. Ces expérimentations seront réalisées en utilisant la Souris, pour laquelle le modèle a déjà été bien décrit dans la littérature scientifique récente. L'intoxication bactérienne est un phénomène complexe qui touche tous les organes des animaux et il est impossible de la reproduire avec des méthodes *in vitro*. Notre projet prévoit d'utiliser au maximum 12 Souris. Il s'agit du nombre minimal indispensable pour obtenir des renseignements préliminaires qui nous permettront de cibler les organes atteints par l'infection et, par la suite, cibler les solutions thérapeutiques.

Pour l'ensemble de ces expériences, la règle des 3R sera respectée. Les animaux seront surveillés quotidiennement et soigné par du personnel qualifié. L'infection par les E. Coli EHE pouvant provoquer une intoxication, tout signe d'affaiblissement et perte d'appétit sera suivi attentivement et des solutions mises en œuvre pour réduire la souffrance avant qu'elle soit trop importante. En effet, la cinétique d'apparition des signes cliniques est bien connue et il est possible d'anticiper l'apparition de la douleur. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux harmonieux dans des animaleries confinées dans lesquelles les conditions d'environnement seront suivies en permanence pour garantir le confort des animaux.

7732 L'aspergillose est une des infections fongiques transmises par voie aérienne la plus fréquente et la plus sévère chez les mammifères et les oiseaux. La contamination est consécutive à l'inhalation de spores microscopiques de champignons filamenteux de l'espèce *Aspergillus fumigatus* principalement. Il peut en résulter une infection dont l'expression clinique varie en fonction de la densité de l'inoculum et du niveau de compétence des défenses immunitaires de l'hôte. La forme clinique la plus grave est appelée aspergillose invasive (AI). Chez l'homme, l'AI est une maladie aiguë qui représente la seconde cause de mortalité par infection fongique nosocomiale. Elle atteint principalement les patients immunodéprimés dont les patients ayant subi une greffe d'organes ou leucémiques. Les particularités anatomiques et physiologiques des oiseaux les rendent particulièrement réceptifs et sensibles à l'infection par *A. fumigatus* qui se développe classiquement au niveau de l'appareil respiratoire profond (poumons et sacs aériens). L'aspergillose demeure ainsi une dominante pathologique chez des espèces d'oiseaux sauvages en liberté (rapaces, canards et apparentés), en captivité (manchots), ainsi que chez des espèces de volière (Psittacidés) et d'élevage (dindes, cailles, canards et poulets). L'apparition des signes cliniques est souvent brutale et la mortalité liée à l'aspergillose aviaire reste élevée, même après administration d'un traitement antifongique. La réponse immunitaire face à une infection aspergillaire implique des moyens de défense cellulaires et humoraux qui participent à l'élimination des spores puis des filaments fongiques. Cependant, cette réponse peut être plus ou moins efficace selon le statut immunologique de l'hôte et la sensibilité intrinsèque de l'espèce animale. L'étude de la réponse immune pulmonaire est indispensable pour mieux comprendre la physiopathologie de l'infection par *A. fumigatus* et pour proposer de nouvelles méthodes de prévention. Toutefois, il n'y a que très peu d'informations concernant les caractéristiques de la réponse immunitaire chez l'hôte suite à l'inhalation des spores d'*A. fumigatus*. Chez les mammifères, une réponse immunitaire de type pro-inflammatoire (activation des cellules polynucléaires, des macrophages résidents et des cellules dendritiques) a été décrite, mais les spores semblent être capables d'inhiber ou de contourner ses mécanismes. L'étude de la réponse immunitaire locale rend indispensable le recours à des modèles animaux, en particulier chez les oiseaux du fait des particularités anatomiques et physiologiques de l'appareil respiratoire dans lequel se développe généralement l'aspergillose. En parallèle, l'aspergillose aiguë expérimentale chez la souris constitue un bon modèle de l'infection chez l'homme et permet d'étudier finement les modalités de la réponse immunitaire

Objectifs du projet :

- Identifier et caractériser la réponse immunitaire locale pulmonaire chez le poulet.
- Développer/adapter des outils moléculaires pour étudier la réponse immune locale pulmonaire chez la dinde.
- Identifier et comparer des marqueurs précoces d'infection aspergillaire dans un modèle murin d'aspergillose aiguë.

Pour cela, nous allons utiliser des techniques d'immunomarquage (immunohistochimie, cytométrie en flux) afin d'étudier la cinétique de la réponse immunitaire locale pulmonaire lors de l'aspergillose aiguë. En complément, nous allons mettre à point des techniques de séparation/purification cellulaire pour caractériser les interactions hôte-champignon, en nous focalisant notamment sur l'activation de la phagocytose.

Pour chaque expérimentation conduite sur les poussins (*Gallus gallus domesticus*) ou les dindonneaux (*Meleagris gallopavo*), nous utiliserons un groupe témoin d'effectif réduit qui nous permettra d'établir des références relatives au système immunitaire chez des animaux non infectés. Au total, nous allons réaliser 4 expériences, la première avec 84 poussins, la deuxième avec 84 dindonneaux, et les deux suivantes avec 40 oiseaux pour chaque expérience (poussins ou dindonneaux). Pour la troisième et quatrième expérience nous utiliserons, si possible, les animaux ayant fait partie des groupes témoins des précédentes expériences, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux.

Une cinquième expérimentation réalisée sur souris, nous permettra de comparer des cibles immunitaires homologues chez le modèle murin et les modèles aviaire, afin de déterminer leur intérêt à la fois fondamental et pratique dans la détection précoce de l'aspergillose aiguë. Compte tenu des contraintes propres au modèle rongeur d'aspergillose qui requiert un protocole immunosuppresseur préalable, nous allons utiliser au moins 7 animaux par groupe afin de nous assurer de la mise en place effective d'une infection aspergillaire. Au total, nous utiliserons 84 souris. Les lots d'oiseaux et de souris seront maintenus en hébergements confinés dans une animalerie adaptée à l'hébergement de ses espèces animales. L'entretien des animaux sera quotidien et répondra aux besoins spécifiques des animaux par rapport à leur âge : accès à l'aliment et à l'eau, hygiène (renouvellement des aliments, de l'eau et de la litière), hébergement en groupes, contrôle de la température ambiante et de la photopériode. Les animaux seront suivis tous les jours tout au long du protocole expérimental, en appliquant le décret 2013-118 et le principe des 3Rs pour le bien-être animal ; nous surveillerons attentivement la survenue et l'évolution des symptômes chez les animaux infectés de manière à pouvoir le cas échéant abréger leur souffrance sans affecter la qualité de nos résultats.

7733 Des niveaux physiologiques de calcium sériques sont indispensables pour de nombreuses fonctions vitales (ex : contraction musculaire et intégrité osseuse). La forme active de la Vitamine D [1 α , 25-dihydroxy-vitamine-D3 (calcitriol)] joue un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie calcique. Les déficiences en vitamine D représentent un enjeu de santé publique, puisque plus de 70 % de la population est concernée, et qu'elles corrélient avec la sévérité des symptômes de pathologies, telles que le diabète de type 1, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn et certains cancers, dont celui du sein et de la prostate. De plus, de nombreuses études précliniques ont mis en évidence l'efficacité du calcitriol à des doses supra-physiologiques pour le traitement de ces pathologies. Cependant, les concentrations requises provoquent une augmentation de l'absorption calcique intestinale, entraînant la calcification des reins, du cœur et des vaisseaux, conduisant au dysfonctionnement de ces organes.

Dans le but de dissocier les activités du calcitriol, de nombreux laboratoires ont synthétisé, par des approches de chimie médicinale, des analogues de la vitamine D. Cependant, aucun des analogues synthétisés ne présente des activités suffisamment dissociées pour une utilisation clinique systémique. De plus, le manque de connaissances des mécanismes responsables de l'absorption calcique vitamine D-dépendante ne permet pas de réaliser des cribles efficaces d'analogues. Ainsi, ce projet vise à identifier ces mécanismes, pour faciliter le crible d'analogues avec une plus large fenêtre thérapeutique.

Remplacement : Les activités de la vitamine D impliquant de nombreux organes, les expériences de physiopathologie seront réalisées sur des souris. Les expériences permettant de comprendre les mécanismes à l'échelle cellulaire pourront être envisagées, le cas échéant, sur des cellules en culture.

Réduction : L'expertise du laboratoire sur l'étude des voies de signalisation de la vitamine D chez la souris permettront la mise en place d'expérimentations de qualité sur un nombre limité de cohortes et la réduction du nombre d'animaux utilisés au strict minimum, tout en s'assurant que les cohortes utilisées permettront de conclure de manière statistiquement significative. Ce projet sur cinq ans est susceptible d'utiliser au maximum 1260 animaux.

Raffinement : une attention particulière sera accordée aux animaux tout au long de leur vie, et les expérimentations seront soumises à des critères précis d'interruption, afin de veiller à ce que chaque animal évolue dans les meilleures conditions qui soient, et sans souffrance.

7734 1-Objectif scientifique du projet :

Malgré des avancées conséquentes dans sa prise en charge et son traitement, le cancer du sein demeure une pathologie associée à un fort taux de mortalité, en particulier pour les sous-types les plus agressifs de cette pathologie. En effet, comparé aux autres sous-types de cancer du sein, ces tumeurs agressives présentent une plus forte proportion de cellules souches tumorales. Ces cellules souches tumorales sont à l'origine des phénomènes de résistances aux chimiothérapies et radiothérapies et participent activement à la formation de métastases.

Le but de ce projet est donc d'identifier de nouvelles cibles exprimées spécifiquement par les cellules souches tumorales dans le cancer du sein. L'identification de telles cibles permettra rapidement de développer de nouvelles thérapies ciblées favorisant l'élimination de cette population de cellules tumorales particulièrement agressives. Ce protocole a été élaboré de telle sorte que l'utilisation des animaux est réduite au minimum et dans le respect de règles strictes visant avant tout à préserver le bien-être animal. Ce projet prévoit l'utilisation au maximum de 90 souris.

2- Retombées attendues dans le domaine de la cancérologie

L'identification de nouvelles cibles des cellules souches tumorales pourraient rapidement aboutir au développement de nouvelles thérapies ciblées, en particulier des immunothérapies. Une telle avancée permettrait de proposer une option thérapeutique alternative pour des patientes atteintes de tumeurs agressives particulièrement résistantes aux thérapies conventionnelles.

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

La mise en culture *in vitro* des cellules souches à partir de tumeurs conduit à leur différenciation. Ceci nous oblige à développer ce modèle *in vivo* afin de conserver les propriétés souches des cellules au sein du microenvironnement tumoral. Le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril l'obtention de résultats nécessaires à la validation de l'hypothèse scientifique. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux permet une classification des procédures expérimentales en limitant au maximum toute souffrance animale.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet : un maximum de 90 souris sur 2 ans en fonction de la tumeur d'origine à greffer (fraîche ou congelée).

7735 Les maladies auto-immunes sont caractérisées par un dysfonctionnement du système immunitaire entraînant l'attaque par l'organisme de ses propres tissus. Il existe environ 80 typologies des maladies auto-immunes et une personne sur 12 en est affectée, représentant ainsi la troisième cause de morbidité dans le monde.

A partir des années 2000 les médicaments issus de la biothérapie, notamment les anti-TNF α (anticorps monoclonaux qui visent le factor de nécrose tumorale alpha), ont révolutionné la prise en charge des maladies inflammatoires chroniques graves et invalidantes comme la polyarthrite rhumatoïde, le psoriasis rhumatoïde, la spondylarthrite ankylosante, ainsi que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la rectocolite hémorragique et la maladie de Crohn.

Les anti-TNF α sont en général bien tolérés mais ces traitements peuvent exposer à d'importants risques d'infection comme la tuberculose et d'autres infections opportunistes. De plus, avec le temps, l'apparition d'une immunisation progressive contre les anti-TNF α peut survenir et être ainsi à l'origine d'un possible échec thérapeutique.

Malgré les avancements importants de ces dernières années, un pourcentage significatif des patients affectés par des maladies auto-immunes ne répond pas aux biothérapies.

Notre programme de recherche vise à découvrir des molécules qui agissent via des mécanismes d'action innovants et qui peuvent ainsi représenter des options thérapeutiques pour tous les patients qui ne répondent pas aux biothérapies. Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées dans une batterie de tests *in vitro* avant d'en sélectionner une dizaine pour

l'évaluation *in vivo*. Après une première évaluation *in vitro* dans des tests cellulaires, les molécules actives montrant un profil pharmacocinétique approprié seront évaluées *in vivo*. Malgré certaines limitations, l'utilisation des modèles animaux dans le domaine des maladies auto-immunes sont des outils indispensables pour comprendre les mécanismes pathogéniques, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, tester l'efficacité et la toxicité de thérapies anti-inflammatoires et immunomodulatrices innovantes. Nos molécules seront évaluées pour leurs capacités à rétablir l'homéostasie immunitaire chez ces animaux malades. Plusieurs modèles rongeurs de maladies auto-immunes ont été mis en place pour la polyarthrite rhumatoïde, pour l'arthrite psoriasique et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles.

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

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

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

L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 30790 souris et/ou 5110 rats sur 5 ans.

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

7736 Chez l'homme, la maladie polykystique rénale autosomique dominante (ADPKD) représente l'une des principales causes de l'insuffisance rénale d'origine génétique et touche plus d'une naissance sur 700-1000 et approximativement 13 millions de personnes dans le monde entier. La maladie est caractérisée par le développement bilatéral de kystes rénaux qui augmentent progressivement la masse de l'organe et conduit à la perte de la fonction rénale. Elle s'accompagne d'une hypertension artérielle et des kystes peuvent se développer également dans le foie et le pancréas. Des atteintes cérébrales vasculaires et cardiaques ainsi qu'au niveau du côlon sont décrites. C'est une maladie hétérogène qui provient de la mutation de l'un des 2 principaux gènes impliqués dans la sensibilité mécanique au flux urinaire, appelés Pkd1 et Pkd2. Les traitements habituels soignent seulement les symptômes. Un seul médicament montre une certaine activité qui reste limitée et qui s'accompagne d'effets indésirables. À l'heure actuelle, il n'y a aucune thérapie efficace contre la maladie et la dialyse et la transplantation d'organes restent l'ultime recours pour les patients atteints d'insuffisance rénale terminale. Le principal objectif de notre projet est de mieux comprendre les mécanismes déclenchant la formation des kystes dans les néphrons en élaborant des études sur des cellules provenant de patients et d'identifier de nouvelles petites molécules capables de corriger précocement la maladie.

De nouveaux composés issus de notre Recherche seront testés pour leur efficacité *in vitro* sur les cellules humaines de patients. Les plus actifs d'entre eux et à condition qu'ils présentent des propriétés pharmacocinétiques acceptables *in vitro* et *in vivo* chez le rat ou la souris, seront évalués dans un modèle *in vivo* d'efficacité chez la souris. Notre démarche consistera à utiliser des souris issues du croisement de deux lignées transgéniques et chez lesquelles nous pourrions contrôler l'induction de la maladie en inactivant spécifiquement le gène Pkd1 par l'administration d'un agent extérieur. Le phénotype des souris restera non dommageable jusqu'à ce que sous l'action de cet agent, la maladie commence à s'installer avec formation et progression des kystes. Nous pourrions ainsi vérifier l'efficacité des molécules préalablement sélectionnées *in vitro*. Dans le cadre de ce projet, plusieurs milliers de molécules seront produites et testées sur les cellules, notamment celles de

patients atteints de la maladie, avant d'en sélectionner une dizaine pour l'évaluation *in vivo* chez la souris.

Dans un premier temps, nous sélectionnerons les souris par croisements successifs jusqu'à ce que 100% des souris obtenues aient le génotype désiré. La maladie touchant les hommes et les femmes avec la même incidence, toutes les souris mâles et femelles qui naîtront seront utilisées pour les études ou la reproduction. Ceci aura pour conséquence de réduire considérablement le nombre d'animaux utilisés dans ce projet.

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

Nous avons également mis en place une plateforme d'imagerie qui permettra de suivre l'évolution de la maladie et l'efficacité de nos composés chez les mêmes souris du début à la fin de l'étude, excluant ainsi le recours à des animaux supplémentaires pour des études séquentielles.

Chez le patient, la présence de kystes reste longtemps indolore et imperceptible jusqu'à ce que le volume kystique devienne important et qu'il entraîne une pesanteur et une douleur diffuse dans le flanc, le dos ou l'abdomen.

Notre stratégie est d'évaluer nos composés au stade précoce de la formation des kystes, lorsqu'ils ne présentent pas encore d'inconfort notable pour la souris. Cependant pour pallier ce risque éventuel, un programme d'analgésie sera mis en place et nous avons établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés.

Pour mener à bien ce projet, nous pensons que nous devons utiliser environ 700 souris pour créer le modèle avec le génotype désiré, puis environ 500 souris par an pour les tests d'efficacité et pour maintenir la colonie. Nous aurons donc besoin au maximum de 2700 souris sur une période de 5 ans. Les études de pharmacocinétiques utiliseront au maximum 3300 souris et/ou 1500 rats sur cette même période.

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

7737 Le cannibalisme est l'acte de tuer et de consommer un individu de la même espèce. Ce comportement est le principal problème auquel se heurtent l'élevage intensif et la domestication du sandre (*Sander lucioperca*), un poisson carnivore d'eau douce. Plusieurs expériences ont été conduites afin d'étudier l'impact de différents facteurs d'élevage (facteurs environnementaux, nutritionnels et populationnels) sur ce comportement. Cependant, chez le sandre, il a été montré que le cannibalisme n'est que très peu influencé par ces facteurs. Par contre, il a été observé que dans les premiers stades de vie, les jeunes cannibales sont des individus qui réussissent à capturer plus facilement des proies (larves de poissons d'autres espèces) et expriment un comportement prédateur plus complet que les non-cannibales, commençant ainsi à se nourrir de poissons plus tôt au cours de leur développement. Le cannibalisme serait alors la conséquence de la mise en présence, dans les structures d'élevage, d'individus de même âge, mais dont certains seraient en avance sur les autres en ce qui concerne leur développement (morphologique, physiologique et comportemental).

Une des solutions pour réduire ce cannibalisme serait donc de fournir des proies potentielles à ces cannibales. Notre but est donc d'étudier l'influence de la présence de larves ou juvéniles d'une autre espèce de poisson sur ce cannibalisme, dans les milieux d'élevage. Pour cela, trois expériences seront réalisées, les deux premières étant étroitement liées. Elles sont nécessairement à réaliser avec des animaux vivants (remplacement non envisageable).

La première expérience consistera à faire cohabiter des groupes de sandres avec des larves d'une autre espèce pouvant leur servir de proies (poissons zèbres). Elle impliquera environ 800 larves de sandre et 1200 de poissons zèbres. Le nombre de sandres et de poissons zèbres a été établi pour

répondre à la fois aux exigences des tests statistiques et de réduction des effectifs tout en ayant un nombre de larves nécessaire pour réaliser l'étude (réduction). Cette expérience sera réalisée dans des enceintes suffisamment grandes pour contenir l'ensemble des larves et permettre aux proies d'éviter les prédateurs (raffinement). Elle comprendra ainsi une procédure de classe sévère, laquelle est la mise en contact des proies avec ces prédateurs, en plus des éventuels cas de cannibalisme. Le comportement des larves de sandre sera comparé à celui de larves du même âge, mais élevés sans la présence de proies. Pour cela, les groupes de larves de sandre, dans les deux modalités, seront filmés et on notera les comportements agressifs, les cas de cannibalisme et de prédation. Nous nous attendons à ce que la présence de proies potentielles dans le milieu d'élevage diminue l'agression et le cannibalisme. Cette expérience durera cinq semaines et, à la fin de celle-ci, des paramètres zootechniques (taux de survie, taille, masse des larves de sandre) seront relevés dans les différents groupes des deux modalités.

Pour la deuxième expérience, deux à trois jours avant la fin de la première, nous prélèverons 10 fois 10 larves de sandre dans chacune des modalités (avec ou sans proies potentielles) de l'expérience 1 que nous placerons dans une arène circulaire, ce qui représente une procédure de classe légère. De la même façon que précédemment, nous filmerons le comportement des larves. De plus, à partir de ces images, nous mesurerons les distances entre individus afin de déterminer la structure sociale du groupe : les larves peuvent se tenir plus ou moins éloignées les unes des autres et avoir plus ou moins de contacts. Nous faisons l'hypothèse que les larves de sandre élevées sans proies potentielles seront plus distantes et plus agressives que celles élevées avec les proies potentielles.

Enfin, dans la troisième expérience, nous nous interrogerons sur les préférences alimentaires des cannibales et des non-cannibales et placerons ainsi les larves (cannibales ou non-cannibales) dans un test de choix entre des larves de leur propre espèce ou de l'espèce proie. Cette procédure sera faite dans un labyrinthe en T et sera de classe légère. Ce test sera réalisé pour 25 cannibales et 25 non-cannibales, obtenus à partir de 400 individus observés et triés, ces chiffres prenant en compte les exigences des tests statistiques, la possibilité d'observation de cannibalismes et le principe de réduction. Les sandres testés ne seront pas mis directement en contact avec les proies potentielles, mais séparés par une paroi transparente percée de trous afin de limiter le stress et les risques de prédation. Dans ce test, nous nous intéresserons au temps passé par chaque larve testée à proximité des autres (proies ou congénères) et noterons le comportement de l'individu testé (tentative d'agression contre la paroi) ainsi que celui des autres poissons (éloignement ou non de la paroi de séparation).

Ces expériences devraient nous fournir de nouvelles informations concernant les facteurs pouvant influencer le cannibalisme dans les premiers stades de vie du sandre. Le but est, si possible, de réduire au maximum ce comportement pour faciliter son élevage et sa commercialisation.

7738 Les maladies inflammatoires chroniques comme la maladie de Crohn, l'arthrite rhumatoïde ou le psoriasis, résultent de dérégulations génétiques ou immunologiques de l'inflammation. Elles induisent des lésions tissulaires sévères entraînant douleurs et handicaps qui empêchent d'effectuer les gestes quotidiens et activités professionnelles. Les maladies inflammatoires d'origine auto-immune affectent à elles seules 9% de la population mondiale et sont une des causes majeures de mortalité chez les femmes jeunes et d'âge moyen. Les traitements actuels (corticoïdes, anti-inflammatoires) réduisent les symptômes mais affectent peu la progression de la maladie. Les traitements biologiques récents (anti-TNF, anti-IL-6) sont plus efficaces mais très coûteux et tous augmentent le risque d'infection. Il est donc urgent de développer des traitements plus efficaces et mieux tolérés. Les études qui constituent ce projet s'inscrivent dans le cadre du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes. Elles nécessiteront l'utilisation de rongeurs pour démontrer l'efficacité des composés et déterminer les doses qui seront administrées chez le patient. Les procédures consisteront à induire une réaction inflammatoire, locale ou systémique par des moyens standards décrits dans la littérature. L'efficacité sera évaluée en mesurant le degré de réduction des signes cliniques et de biomarqueurs de la maladie. Dans le contexte de ce projet, il n'y a pas d'alternative au recours à l'animal de laboratoire. Cependant son utilisation permettra le développement de nouveaux traitements pouvant avoir un impact positif considérable sur la qualité de vie de millions de patients sévèrement affectés par les maladies inflammatoires.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement :

Des animaux de laboratoires doivent être utilisés parce qu'à notre connaissance, il n'existe pas de modèles *in silico* ou *in vitro* qui reproduisent l'extrême complexité des maladies inflammatoires chroniques, celles-ci impliquant de nombreux tissus et organes, et dont les mécanismes biologiques sous-jacents sont encore insuffisamment compris. Seul un modèle chez l'animal peut reproduire les interactions de ces systèmes biologiques complexes nécessaires pour évaluer l'efficacité des composés à tester.

Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés sera basé sur des études similaires reportées dans la littérature. Des analyses de puissance statistique seront utilisées sur les données préliminaires pour déterminer si le nombre d'animaux par groupe puisse encore être réduit.

Raffinement :

Les animaux seront hébergés dans des locaux conformes aux standards réglementaires. Ils seront groupés dans des cages contenant de l'enrichissement et des matériaux spécialisés pour faciliter la nidification. Les procédures potentiellement douloureuses ou source d'inconfort ou de stress se feront sous anesthésie gazeuse de courte durée. Les animaux feront l'objet d'une surveillance clinique et sanitaire journalière sur la durée de l'étude. Des consignes seront mises en place pour définir les procédures à suivre en cas de complications. Des soins adaptés seront donnés aux animaux affectés, par ou sous autorité du vétérinaire ou euthanasiés selon les critères définis dans la consigne.

Le projet nécessitera un maximum de 20 000 rongeurs, soit 4 000 par an, pendant 5 ans.

7739 Les tumeurs cérébrales de type glioblastomes (GBM) représentent un défi en oncologie. Malgré les énormes efforts de recherche, les progrès thérapeutiques restent mineurs, en raison notamment de l'existence, au sein de ces tumeurs, de populations cellulaires très hétérogènes. En particulier, la présence de cellules souches tumorales (GSC pour glioblastoma stem cells) confère des propriétés d'agressivité et de résistance aux GBM.

Nous avons montré l'implication particulière d'une intégrine (protéine membranaire exprimée par les cellules tumorales) dans l'agressivité et la résistance aux thérapies des GBM. Récemment, nous avons émis l'hypothèse qu'il pouvait exister une hétérogénéité pour l'expression de cette intégrine au niveau des GSC. Nos résultats *in vitro* ont confirmé l'existence de différentes populations de GSC, certaines capables d'exprimer l'intégrine et d'autres non, et montrent que l'expression de l'intégrine confère des caractéristiques pro-tumorales aux GSC (prolifération, migration). Ces résultats nécessitent d'être confirmés *in vivo* chez l'animal où les GSC se trouveront dans un environnement plus proche de la pathologie humaine, afin de tenir compte du microenvironnement tumoral et de la présence de la barrière hémato-encéphalique. A l'heure actuelle, aucune méthode alternative *in vitro* ne peut refléter une telle complexité et donc, remplacer ces modèles (Remplacement).

Dans ce projet, nous envisageons de réaliser des greffes intracérébrales de 6 lignées de GSC humaines exprimant chacune des taux variables de l'intégrine et nous évaluerons leur capacité à former des tumeurs et leur degré d'agressivité (4 à 8 souris par lignée seront nécessaires, soit un total de 48 souris maximum). Il s'agit là d'une appréciation globale du nombre d'animaux mais les expérimentations seront menées sous forme de 2 séries consécutives afin d'ajuster (à la baisse) le nombre d'animaux nécessaires en fonction des résultats observés lors de la première série (Réduction). Les animaux sont placés en cages multiples et le bien-être des animaux fait l'objet d'un suivi quotidien; les souris seront anesthésiées dès lors que des procédures stressantes et/ou douloureuses seront réalisées (implantation de tumeur), et mises à mort si l'un des points limites est atteint avant la fin de l'étude (Raffinement).

Trente jours post-implantation ou lors de l'apparition des premiers signes de troubles moteurs ou neurologiques, les animaux seront mis à mort par une surdose d'anesthésique et les cerveaux seront prélevés pour une analyse morphologique (analyses anatomopathologiques). Ces prélèvements permettront d'obtenir des informations sur la croissance et l'éventuelle dissémination tumorale dans le tissu sain. Il est à noter que le laboratoire possède déjà une bonne expertise dans l'obtention de

modèle de tumeurs cérébrales chez le rongeur. Les résultats obtenus dans cette étude permettront de clarifier le rôle de l'intégrine dans l'agressivité de certains glioblastomes mais également de mettre au point des modèles expérimentaux pertinents pour tester de nouvelles associations thérapeutiques incluant des inhibiteurs d'intégrines.

7740 Parmi les maladies métaboliques, le diabète de type II est un trouble métabolique caractérisé par une hyperglycémie chronique résultant de défauts dans la sécrétion d'insuline. L'insuline a un rôle essentiel dans le métabolisme des glucides, des lipides et des protéines. La résistance à l'insuline et l'obésité sont principalement responsables du diabète de type II. Actuellement aucune stratégie n'existe pour prévenir ou guérir le diabète de type 2. La Fédération de Diabète Internationale a évalué à 382 millions le nombre de patients diabétiques en 2013 (la majorité entre 40 et 59 ans). Cependant, des découvertes récentes laissent à penser que le dysfonctionnement de certaines cellules pancréatiques est au cœur du mécanisme pathogénique du diabète de type II. Nous nous intéressons également au tissu adipeux brun et notamment à son développement. Une meilleure connaissance pourrait permettre le développement de nouvelles cibles thérapeutiques anti-obésité et anti-diabète.

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

L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 14560 sur 5 ans. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés au strict nécessaire, nous utilisons un logiciel de lois statistiques permettant de calculer le nombre minimum de souris nécessaire pour montrer que l'effet de nos composés est significatif par rapport aux animaux malades contrôles. Nous avons aussi mis en place une plateforme d'imagerie qui permet de suivre l'évolution de la maladie et de l'efficacité de nos composés sans avoir à mettre séquentiellement des animaux à mort. Certains de nos modèles peuvent apporter de l'inconfort. Nous avons donc établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés. Pour chaque modèle, un programme d'analgésie sera mis en place.

Enfin, la veille de la littérature nous permet de remplacer certains modèles ou procédures par de nouveaux modèles tout aussi pertinents mais présentant moins d'impact sur le bien-être animal. Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé en continu (température, pression, hygrométrie, renouvellement d'air, alternance jour/nuit) relié à un système d'alarme. Ils bénéficieront d'un enrichissement du milieu adapté à l'espèce et à l'étude. La densité dans les cages sera en conformité avec les recommandations et autant que possible, les groupes d'animaux dans les études resteront ceux formés pendant l'acclimatation. Les animaux et leurs conditions d'hébergement (environnement, nourriture, eau de boisson) seront sous surveillance quotidienne.

7741 Depuis toujours l'homme a observé les animaux car sa survie dépendait de la connaissance de leur comportement. Aujourd'hui, l'étude comportementale d'espèces protégées aide les biologistes de la conservation à réduire les dégâts involontaires causés aux espèces. De plus, la meilleure connaissance du comportement animal permet de limiter la perte de temps et d'argent due à la mise en œuvre de plans de conservation mal adaptés. Notre projet propose d'étudier les mécanismes par lesquels des signaux et des indices parviennent à un individu receveur et en modifient le comportement. En effet ces signaux et indices pourraient être involontairement changés ou brouillés à cause des actions de l'homme (des bons exemples sont représentés par les changements climatiques ou l'introduction d'organismes exogènes). Les signaux proviennent d'autres individus et interviennent dans la communication, notamment dans la formation des couples (sélection sexuelle). Les indices proviennent de l'environnement et interviennent dans la perception du milieu et sont notamment impliqués dans la navigation et le mouvement dans l'espace. Les signaux sont ces impliqués dans la communication entre individus (exemple communication acoustique ou olfactive).

Les modèles biologiques concernés par notre projet sont essentiellement les pétrels nichant dans des terriers souterrains et les manchots royaux (*Aptenodytes patagonicus*). L'originalité de ce projet réside dans le fait que les différentes modalités sensorielles (olfaction, audition, vision), impliquées dans la perception des signaux et indices externes, seront abordées séparément mais aussi en synergie. Ce volet concerne les travaux prévus chez les manchots royaux, le volet concernant les pétrels sera présenté comme demande séparé. S'agissant d'études comportementales sur la faune sauvage évoluant dans leur milieu naturel, il n'est pas possible de passer à des modèles *in vitro* ou *in silico*. Les exigences de remplacements, réduction et raffinement ont été prises en compte, sachant que les modèles d'étude sont des espèces sauvages. Pendant les 4 ans du projet 20 manchots royaux adultes par an et 50 manchots royaux poussins seront soumis à des actes identifiés comme « expérimentation animale ». De plus, on équipera de puce électronique 300 poussin et 120 adultes par an. Le nombre total d'animaux utilisés sur la durée du programme (1960 manchots) est réduit au minimum permettant une analyse statistique adéquate. Nos études visent à obtenir des réponses comportementales naturelles, autrement dit, non biaisées par le stress ou la manipulation. Par conséquent la manipulation de tous les sujets est rapide (15 min environ) et tout est mis en jeu pour que l'animal relâché soit dans un état qu'on pourrait définir comme « normal » c'est-à-dire, comme s'il n'avait pas été manipulé.

7742 La nanotechnologie est en plein essor industriel depuis le début du XXIème siècle. Les propriétés exceptionnelles et innovantes des nanoparticules (NP), acquises par leur taille nanométrique, les rendent en effet très intéressantes pour l'industrie. Ainsi, on retrouve les NP dans différents domaines d'application comme la médecine, l'industrie cosmétique, les secteurs agroalimentaires et électroniques.

Cependant, et malgré les bénéfices importants que les NP apportent, leur utilisation exponentielle lors de ces dernières années suscite des inquiétudes quant à leurs potentiels effets sur la santé de l'Homme et sur l'environnement. De plus, il est déjà bien connu que les polluants atmosphériques, incluant les particules ultrafines, peuvent avoir des effets néfastes sur la santé, en particulier au niveau pulmonaire. Les études toxicologiques des nanomatériaux sont donc nécessaires pour connaître le risque de leur utilisation. Des études ont en effet montré que les NP, comme les NP d'oxyde de cérium (CeO₂) qui sont retrouvées dans les pots catalytiques des voitures ou utilisées comme additif au carburant diesel, pouvaient induire un remodelage pulmonaire (comme la fibrose) et cela était associé à des réponses biologiques (notamment la réponse inflammatoire et le stress oxydant).

Les effets toxiques des NP démontrés *in vivo* ont incité les chercheurs à s'interroger sur les risques potentiels d'une exposition pendant la gestation, période de grande susceptibilité aux molécules exogènes. Des études ont montré que l'exposition de souris gestantes à diverses NP manufacturées est associée à des hypotrophies fœtales, une neurotoxicité, et une atteinte rénale chez la progéniture. Ces résultats ont toutefois été le plus souvent obtenus après exposition maternelle aux NP par voie intraveineuse ou sous-cutanée, et rarement par voie respiratoire. Les NP manufacturées pourraient interagir avec le développement pulmonaire normal du fœtus. Ceci est suggéré par la récente démonstration que l'exposition de souriceaux nouveau-nés à des NP de dioxyde de titane par instillation intranasale est associée à une inflammation pulmonaire et une altération du développement pulmonaire. Mesurer les conséquences d'une exposition par voie respiratoire à des NP manufacturées sur le développement respiratoire de la descendance est important. En effet, il est connu que l'exposition *in utero* à des facteurs environnementaux, comme le tabagisme maternel, est susceptible d'altérer le développement fœtal des voies aériennes et/ou du poumon distal, mesurables par une augmentation de la morbidité respiratoire postnatale et une détérioration définitive des fonctions respiratoires. Si de telles altérations sont observées après exposition aux NP, elles pourraient constituer un facteur de susceptibilité important aux maladies respiratoires chroniques de l'adulte. Une récente étude *in vivo* a de plus montré que suite à une exposition de lapines gestantes à des NP de la pollution atmosphérique (diesel) par voie pulmonaire, des effets sur la descendance (1ère et 2ème génération) ont été observés, ces altérations étant associées à des anomalies placentaires (diminution de l'efficacité placentaire et diminution du flux vasculaire placentaire).

Une étude menée dans notre laboratoire a montré, que l'exposition pulmonaire à forte concentration de NP pendant la gestation induisait une altération du développement pulmonaire de la descendance

quelle que soit la nature chimique de la NP utilisée. Cette présente demande d'autorisation de projet s'inscrit dans la continuité d'une précédente demande.

L'objectif de ce projet est d'évaluer les effets d'une exposition pulmonaire de souris femelles gestantes à des NP de CeO₂, à différentes doses, sur le développement pulmonaire de la descendance de la première et la deuxième génération. L'étude dose-réponse va permettre ainsi de déterminer à partir de quel niveau de dose une exposition non-intentionnelle de NP pendant la gestation est associée à un risque pour la santé de la descendance. De plus, afin de mesurer la susceptibilité pulmonaire de la descendance à un autre toxique exogène, un groupe de souris exposé par voie respiratoire pendant la gestation aux NP de CeO₂, sera exposé à la fumée de cigarette (pour le modèle de broncho-pneumopathie chronique obstructive), un autre groupe de souris exposé par voie respiratoire pendant la gestation aux NP de CeO₂, sera exposé à la bléomycine (pour le modèle de fibrose pulmonaire). Dans ces deux procédures, des prélèvements pulmonaires en vue des analyses biologiques et histologiques seront réalisés. Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 820 souris au total. Afin de réduire le nombre d'animaux et d'après nos résultats antérieurs, nous estimons que 6 à 10 souris par groupe (selon le type d'analyse) sont nécessaires pour obtenir une différence statistiquement significative, en tenant compte des pertes d'animaux durant les périodes d'expérimentation. Ce nombre d'animaux par groupe d'exposition est nécessaire pour les analyses morphométriques et biologiques. Les données des différents groupes seront comparées entre elles à l'aide d'un test Anova, suivi d'un test de Kruskal-Wallis.

Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, ainsi les animaux présentant un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer.) seront euthanasiés après anesthésie à l'isoflurane. Afin d'enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

7743 Les mésaventures thérapeutiques, l'ingestion illicite de médicaments, ou la tentative de suicide par l'utilisation de substances nocives produisent une importante toxicité chez l'homme. Elle constitue un grave problème de santé publique dans le monde entier qui provoque à la fois un coût important sur le plan financier, de nombreux problèmes de santé, voire la mort. Malheureusement, pour la grande majorité de ces intoxications, il n'existe pas d'antidotes pharmacologiques spécifiques. Pour résoudre ce problème, actuellement il existe peu de moyens de détoxication et ils sont insuffisamment appliqués. Il s'agit principalement de charbon actif, le vomissement induit par l'ingestion d'ipécacouana ou le lavage gastrique. Cependant, ils sont accusés d'être inefficaces car trop tardifs, en retardant d'autres interventions plus efficaces, voire de causer des complications inutiles et d'induire des contre-indications considérables qui limitent leur utilisation. Ainsi, un traitement rapide et efficace de détoxication reste toujours un vrai défi.

Pour atteindre cet objectif, les solides inorganiques-organiques poreux (MOFs par les sigles en anglais Metal Organic Frameworks) constituent un nouvel outil très prometteur pour la détoxication de toxines ou médicaments (surdosage). En effet, ces solides poreux agissent comme des « éponges chimiques » adsorbant de forme sélective une grande quantité de médicament ou toxine dans ses pores.

Ce projet de recherche a donc l'ambition de développer ces éponges chimiques, spécialement conçues pour la détoxication humaine/animale. Nous avons sélectionné deux molécules toxiques à haute dose (intoxication accidentelle ou par surdosage thérapeutique fréquente) avec de différentes propriétés physicochimiques : l'ibuprofène et l'aspirine. L'intoxication orale par surdosage avec ces deux médicaments, couramment utilisées et d'accès facile, est à craindre chez les sujets âgés et surtout chez les jeunes enfants, chez qui elle peut être mortelle.

En effet, certaines éponges ont démontré une capacité d'adsorption très rapide et sélective de l'ibuprofène et de l'aspirine dans les milieux gastro-intestinaux simulés, ce qui est très important lors d'une détoxication. Cependant, l'efficacité des agents détoxifiants doit être confirmée sur l'animal vivant en étudiant la distribution du médicament dans l'organisme (impliquant le passage à travers un grand nombre de barrières biologiques telles que l'estomac, le duodénum, l'intestin, les reins, le sang, etc.). Ainsi, l'étude du devenir *in vivo* du médicament et des éponges sera menée à bien en simulant des conditions réelles de surdosage par l'administration du médicament voie orale chez le rat (*Rattus*

norvegicus) suivie de l'administration des éponges. Cette étude permettra une meilleure maîtrise de la dose nécessaire à administrer de l'éponge et le temps d'administration après le surdosage, permettant ainsi d'optimiser l'obtention d'un effet détoxifiant significatif tout en évitant tout phénomène de toxicité.

La "règle des 3R" a été rendu obligatoire par la directive européenne 2010/63 et comprend les points suivants : Réduire le nombre d'animaux en expérimentation, Raffiner la méthodologie utilisée, et Remplacer les modèles animaux. Toutes les procédures de ce projet sont conçues pour respecter ce principe :

i) une planification statistique minutieuse a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux tout en préservant la validité statistique de l'étude, et pour avoir une puissance statistique suffisante pour observer un effet,

ii) la méthodologie appliquée a été optimisée pour supprimer la douleur subie par les animaux et pour obtenir les informations pertinentes; toutes les procédures seront pratiquées en utilisant des anesthésiques et des analgésiques, et

iii) les meilleures éponges ont été déjà sélectionnées utilisant des modèles *in vitro*, avec de bons résultats.

Malheureusement, la complexité d'un animal, avec un système digestif complexe ainsi qu'un système circulatoire distribuant le médicament aux différents tissus spécialisés, fait que l'animal ne peut pas être remplacé par des modèles *in vitro* (ou *in silico*). Ainsi, afin de déterminer l'efficacité détoxifiante des éponges, nous devons évaluer l'absorption gastro-intestinale et la distribution dans les différents tissus du médicament et l'éponge après son administration. Pour réduire le nombre d'animaux, nous avons divisé le projet expérimental en deux procédures. La première procédure est essentielle parce qu'elle nous permettra de sélectionner les meilleurs matériaux qui seront ensuite utilisés à la seconde procédure (réduction). Egalement, dans la procédure expérimentale 1, les extraits intestinaux seront récupérés pour faire expériences *ex vivo*.

Pour cela, un groupe de 152 animaux sera utilisé pour évaluer la détoxification à niveau gastrique, mesurant la quantité restante de médicaments en présence ou en absence de l'éponge. Afin de réduire le nombre d'animaux, après l'euthanasie de ce groupe, le prélèvement des intestins sera effectué afin d'évaluer le passage intestinal du médicament à l'éponge. Ces études permettront de sélectionner la meilleure éponge pour chaque médicament étudié.

Une seconde étude (429 animaux) sera réalisée afin de déterminer la concentration en sang (pharmacocinétique) et la distribution du médicament et l'éponge dans les différents tissus (intestin, foie, rein, sang, etc.) en fonction du temps (pendant 24 heures).

Réduction du nombre des animaux : 6 animaux par groupe est le nombre minimal d'animaux pour obtenir des résultats statistiques exploitables. Nous devons considérer des groupes contrôles (en absence de traitement, avec le médicament pure et l'éponge pure) afin de comparer la capacité de détoxification de ces matériaux. En outre, la sélection des meilleures couples médicament-éponge dans la première procédure expérimentale permettra aussi de réduire le nombre des animaux.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de : $152 + 429 = 581$ rats.

De l'enrichissement sera ajouté dans les cages des animaux. Les animaux seront surveillés quotidiennement et leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer que les animaux ne subissent aucun stress.

7744 Comprendre les origines du langage est un défi en sciences humaines et en biologie évolutive. Si le langage est un attribut humain, une de ses composantes - l'apprentissage vocal - est partagée avec d'autres espèces, dont les oiseaux chanteurs (oscines). Chez le Diamant Mandarin (*Taeniopygia guttata*), les mâles apprennent à chanter pendant une période sensible de la vie précoce (comprise entre 25 et 90 jours après l'éclosion), en imitant principalement le père. Dans des conditions normales, chaque mâle produit un chant différent (durée : 1-1.5 sec). Au cours d'une expérience précédente, nous avons sélectionné des oiseaux qui ont réussi à produire une copie fidèle d'un même modèle de chant diffusé par haut-parleur. Nous avons utilisé ces mâles comme fondateurs d'une colonie et nous avons étudié l'évolution du chant au sein de colonies où tous les mâles chantent le même chant. Nous

avons suivi 3 colonies : deux colonies de type A (A1 et A2 ; mâles fondateurs produisant le chant A) et une colonie de type B (mâles fondateurs produisant le chant B). Nous avons observé que les mâles éclos au sein de ces 3 colonies ont produit dans la majorité un chant proche du modèle originel. Si le chant chez le Diamant Mandarin est utilisé pour courtiser les femelles, il est probable que le chant soit également utilisé comme une signature de groupe afin de faciliter la cohésion sociale pendant les déplacements. C'est le cas par exemple chez une autre espèce de passereaux qui vit en groupes sociaux, l'Etourneau Sansonnet (*Sturnus vulgaris*). Afin de vérifier si le chant constitue une signature de groupe, nous allons tester des diamants mandarins issus des 3 colonies dans différentes tâches d'apprentissage social et de coopération, inspirées de celles développées pour étudier la coopération chez les primates et plus récemment chez les oiseaux. Nous faisons l'hypothèse que des diamants mandarins imiteront (expérience de choix alimentaire) ou coopéreront plus facilement avec un mâle qui chante le chant prototypique de leur colonie. Puisque nous disposons de 2 colonies de type A (A1 et A2 : oiseaux non familiers entre ces 2 colonies), nous pourrions vérifier que c'est bien le type de chant produit et non pas la familiarité (appartenance à la même colonie) qui facilite l'apprentissage social ou la coopération. Nous testerons également les femelles des 3 colonies. Même si les femelles ne chantent pas, nous faisons l'hypothèse qu'une femelle choisira préférentiellement un démonstrateur (tâche d'apprentissage social) ou coopérera plus facilement avec un mâle chantant le chant prototypique de sa colonie d'origine.

Mesures prises pour le respect de la règle des 3Rs :

Replacer : cette expérience a pour but de mesurer une dimension peu explorée dans l'étude des fonctions du chant des oiseaux : l'influence du chant sur l'apprentissage social et la coopération au sein du groupe. Le Diamant Mandarin est considéré comme la « souris volante » de la recherche sur le chant des oiseaux. Ce petit animal domestique est facile à élever en captivité. Aucune autre espèce animale capable d'apprentissage vocal ne se prête mieux à ce type d'étude. Les résultats de cette expérience seront comparés à ceux d'une étude réalisée actuellement chez des bébés/enfants humains, et visant à vérifier si des enfants imitent le choix et/ou coopèrent plus facilement avec des individus parlant leur langue maternelle.

Réduire : afin de garantir un traitement statistique correct des données, les oiseaux des 3 colonies (n= 90 mâles + 90 femelles) seront testés : 1) avec un mâle de leur colonie (familier) ; 2) avec un mâle non familier mais produisant le chant prototypique de leur colonie (ex : individu de la colonie A1 avec mâle de la colonie A2) ; 3) avec un mâle de la colonie produisant un chant différent (et donc forcément non familier, par exemple individu de la colonie A1 avec mâle de la colonie B ou individu B avec mâle A2...)

Des femelles de chaque colonie (n=90) seront également testées dans les 3 conditions.

Nous testerons tous les oiseaux de nos 3 colonies mais nous prévoyons une fonte des effectifs pour les expériences de coopération qui nécessiteront un apprentissage instrumental (conditionnement opérant).

Raffiner : différentes mesures seront prises pour réduire le stress au cours de nos expériences. Pour les expériences de coopération, les oiseaux seront privés temporairement de nourriture et devront travailler pour obtenir une récompense alimentaire. A la fin de chaque journée pour ces expériences, les oiseaux pourront avoir accès à la nourriture ad libitum jusqu'à l'extinction de la lumière. Ils seront placés en isolement physique mais pourront tout au long de l'expérience communiquer vocalement voire visuellement avec des congénères.

A la fin des expériences, les oiseaux ne seront pas euthanasiés.

Mots clés : chant, oiseaux, communication vocale, coopération, apprentissage social, choix alimentaire, Diamant Mandarin, *Taeniopygia guttata*.

7745 Les délétions partielles ou totales (par des approches d'interférence ou de mutation génétique) de protéines clefs du trafic intracellulaire entraînent de nombreuses altérations physiologiques et anatomiques. Le projet a pour objectif d'identifier chez la souris ces altérations en s'intéressant plus précisément à des protéines ubiquitaires pour lesquelles il a été montré qu'elles étaient associées au développement de pathologies rares chez l'homme, nommées les ciliopathies. Ces maladies se caractérisent par des altérations dans le système nerveux central et dans certains organes

périphériques incluant en particulier le rein et le système reproducteur. Il n'existe à ce jour aucune thérapeutique efficace pour soigner les ciliopathies, les recherches qui visent à comprendre les mécanismes à l'origine de symptômes permettront d'ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les patients. Dans ce contexte, l'utilisation de stratégies de réexpression des protéines normales dans des souris transgéniques qui modélisent les pathologies afin de corriger des altérations est essentielle. Ce projet s'attèlera à respecter la règle des 3R. Ainsi, de nombreuses études *in vitro* (remplacement), la caractérisation déjà réalisée des modèles murins (brevet et publication en cours de rédaction) et l'expertise des manipulateurs qui réaliseront les études *in vivo* ont permis la réduction du nombre total de souris pour les 5 ans (82) et le raffinement des procédures opératoires pour assurer le bien-être animal et éviter la souffrance.

7746 Dans le cadre de notre activité de surveillance sanitaire du marché français et européen, nous sommes conduits à contrôler des produits de santé à base d'érythropoïétine (EPO) qui sont mis sur le marché par les entreprises pharmaceutiques. Ces produits sont utilisés dans divers traitements :

- traitement de l'anémie secondaire à une insuffisance rénale chronique chez les enfants et les adultes hémodialysés et les patients adultes en dialyse péritonéale ;
- traitement de l'anémie sévère d'origine rénale accompagnée de symptômes cliniques chez les patients adultes insuffisants rénaux non encore dialysés ;
- traitement de l'anémie et réduction des besoins transfusionnels chez les patients adultes traités par chimiothérapie pour des tumeurs solides, des lymphomes malins ou des myélomes multiples et à risque de transfusion en raison de leur état général (par exemple état cardiovasculaire, anémie préexistante au début de la chimiothérapie).

Le contrôle de ses produits consiste en plusieurs tests physico-chimiques et biologiques dont un test d'activité permettant de doser la teneur en EPO. Ce test est réalisé *in vivo* selon une méthode décrite à la pharmacopée européenne (Monographie 1316) et fait donc l'objet de cette saisine. Les méthodes de la pharmacopée ont été validées par les laboratoires européens à partir d'essais collaboratifs pour éviter que chaque laboratoire ait à revalider les méthodes (souche d'animaux, nombre, dose, injection, prélèvement, ...) ce qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés en expérimentation animale. Par ailleurs, dans la mesure du possible, nous nous efforçons de regrouper les analyses de produit afin de réduire également le nombre de souris utilisées. Les souris sont hébergées dans des cages IVC, ces cages renforcent le confinement sanitaire et limitent les bruits extérieurs et ainsi le stress des souris. Les souris disposent d'une maison en plastique et de lamelles cartonnées ou de carrés de cellulose.

Cette autorisation de projet est demandée pour une durée de 5 ans et, en se basant sur le programme 2017, utilisera environ 4000 souris.

7747 En France, des données récentes de l'enquête nationale sur la mortalité maternelle montrent que l'hémorragie obstétricale est toujours la première cause de mortalité maternelle, responsable de 16 % des décès. Cette cause de mortalité maternelle est plus importante en France que dans les autres pays européens. En outre, plus de 80 % de ces décès peuvent être évités par des soins obstétricaux adaptés. Ainsi chaque maternité doit être en mesure d'assurer des techniques chirurgicales d'hémostase conservatrices ou non. Une enquête réalisée par le réseau dédié auprès de l'ensemble des gynécologues-obstétriciens de Midi-Pyrénées a mis en évidence une hétérogénéité de la formation initiale et des compétences vis-à-vis de la réalisation de l'hystérectomie d'hémostase. Il n'existe aucun modèle (mannequin, utérus isolé) permettant de simuler la prise en charge des hémorragies. La brebis est un modèle pertinent pour la pratique obstétricale car l'utérus de la brebis gravide à terme représente un modèle proche de l'utérus de la femme. Pour améliorer la prise en charge globale des hémorragies du post-partum chez la femme, le réseau dédié souhaite mettre en place, en partenariat avec l'école vétérinaire, une formation destinée aux obstétriciens, conformément aux recommandations pour la pratique clinique du Collège National des Gynécologues et Obstétriciens français émises en 2014. Cette formation sera réalisée en partenariat avec l'école vétérinaire, sur un modèle de brebis en fin de gestation. Le nombre d'animaux (une brebis pour 2 obstétriciens) correspond au nombre minimum qui permettra à chaque obstétricien de savoir gérer les techniques d'hémostase. Le nombre maximum de 60 brebis sur 3 ans correspond à 10 sessions

de formation par an. Les animaux seront introduits vers 50 jours de gestation. Ils seront hébergés dans les installations expérimentales, dans un bâtiment fermé et doté d'une ventilation naturelle et des conditions naturelles d'éclairage et de température. Ils seront logés dans les boxes collectifs avant la chirurgie (8-12 brebis dans un box de 27 m²). La paille sera utilisée comme litière. Les brebis seront maintenues sous anesthésie gazeuse dans une salle chirurgicale, et après césarienne, les techniques d'hémostase seront mises en pratique par les obstétriciens. Les brebis seront euthanasiées à l'issue de la formation. Un protocole d'anesthésie générale et d'analgésie adapté est appliqué lors de la chirurgie pour limiter la douleur et le stress.

7748 Les méningites bactériennes, et notamment à *Streptococcus pneumoniae*, demeurent une pathologie difficile à traiter avec un taux élevé de mortalité et de séquelles tardives, malgré les avancées thérapeutiques. L'une des principales séquelles est la surdité de perception unie ou bilatérale qui peut toucher 30% des survivants.

Notre étude s'attachera donc à évaluer l'action de différentes molécules (fluoroquinolone, mélatonine), déjà reconnues dans d'autres applications, afin de limiter l'atteinte auditive au cours des méningites bactériennes par rapport au traitement de référence la dexaméthasone.

Le rat présente un taux de complications lors de méningites à pneumocoques proche de celui humain. Ce modèle présente également d'autres avantages : le rat est un animal très accessible, les atteintes histologiques de la cochlée sont bien connues de l'unité qui les a évaluées à plusieurs reprises.

Afin de déclencher une inflammation cérébrale, 84 rats recevront en intra-cérébral du LPS.

18h après l'injection du LPS, les rats recevront le traitement au sein de 4 bras, et ce pour une durée de 4 jours :

- Placebo
- Mélatonine
- Fluoroquinolone
- Dexaméthasone

L'audition sera évaluée par un test objectif de l'audition (les potentiels évoqués auditifs) 1 semaine puis 3 semaines après l'infection.

A 3 semaines, les rats seront sacrifiés puis les cochlées et les cerveaux seront prélevés. Une analyse histologique et immuno-histochimique des cochlées sera réalisée afin d'analyser l'architecture cochléaire et de rechercher des éléments en faveur d'une inflammation (infiltrat cellulaire, remaniement, fibrose...) et d'une labyrinthite ossifiante.

Nous espérons démontrer un effet anti-inflammatoire au sein de la cochlée en particulier une baisse de la survenue de la labyrinthite ossifiante.

Règle des 3 R :

- Réduction : Compte-tenu de la mortalité liée au modèle d'infection par le pneumocoque, nous avons déterminé le nombre minimal de rats nécessaires dans chaque sous-groupes permettant d'avoir une analyse statistique, significative ou non, soit 20 rats par sous-groupe. Une première série de 4 rats recevra une injection intracérébrale de LPS pour évaluer l'effet inflammatoire de LPS sur l'audition de l'animal.

- Raffiner : Les signes extérieurs de souffrance chez le rat (rat prostré ou au contraire très agité, fuyant, aux poils hérissés) seront les critères de points limites, à partir desquels le rat sera euthanasié.

- Remplacer : compte-tenu de la variabilité de l'atteinte par le pneumocoque selon les espèces et de la complexité de structure de l'oreille interne, il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres modèles non animaux.

7749 Le projet de recherche fondamentale et translationnelle que nous mènerons pendant 5 ans vise à évaluer l'impact d'une thérapie sur la captation de la méthionine par des cellules tumorales humaines implantées chez la souris.

Les cancers agressifs et récalcitrants - dont le cancer gastrique qui occupe actuellement le quatrième rang mondial en termes de mortalité fait partie - sont un problème de santé publique majeur pour lequel aucune thérapie efficace n'a été développée. Ces cancers, le plus souvent diagnostiqués à un stade avancé, sont associés à un pronostic faible et une espérance de vie courte.

Le développement de nouveaux traitements nécessite une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans la survenue de ces cancers. Des tests pharmaceutiques sur des modèles animaux sont donc indispensables pour pouvoir évaluer l'efficacité des traitements et mieux comprendre leurs mécanismes d'action.

La L-méthionine est un acide aminé essentiel à la prolifération tumorale. Cette dépendance à la L-méthionine est maintenant étudiée afin de mettre en place de nouvelles thérapies basées sur la déplétion systémique de cet acide aminé, permettant « d'affamer » les tumeurs et ainsi les faire régresser.

L'objectif initial de cette étude est d'évaluer *in vivo* la captation de la L-méthionine par les cellules tumorales chez la souris. Cette captation sera évaluée à l'aide d'une lignée cellulaire établie à partir d'un cancer gastrique humain et implantée de façon sous-cutanée chez la souris. L'évaluation sera réalisée par imagerie Tomographie par Emission de Positons en utilisant comme traceur une L-méthionine radiomarquée au carbone 11, tout d'abord avant traitement afin de connaître le taux de captation basal des tumeurs, puis suite à l'injection intraveineuse d'une thérapie visant à réduire la concentration de L-méthionine présente dans le plasma. Le taux d'incorporation de la méthionine radiomarquée par les cellules tumorales sera rapporté au volume de la tumeur, évalué parallèlement par technique d'imagerie par résonance magnétique.

Application de la règle des 3R et nombre d'animaux :

Jusqu'à maintenant, l'impact de la thérapie n'avait pu être mesuré que par la diminution de L-méthionine dans le plasma sanguin. Il est maintenant nécessaire de visualiser et mesurer *in vivo* l'impact de la thérapie directement sur les cellules tumorales. Le recours à un organisme entier est indispensable. Cette étude qui ne nécessite que très peu d'animaux (12 souris Nude, réparties en 3 groupes), permettra de confirmer l'intérêt de développer un traitement ciblant spécifiquement la L-méthionine plasmatique dans un contexte oncologique. Selon les résultats de cette étude, une autre étude avec le même nombre d'animaux (n=12) pourra être conduite si des paramètres expérimentaux nécessitent d'être ajustés. Les avantages de la technique d'imagerie employée reposent sur le fait qu'elle est non invasive. On peut ainsi utiliser le même animal tout au long de la procédure. Ceci permet un suivi intra-sujet qui augmente la puissance statistique de l'étude et permet de réduire le nombre d'animaux à inclure. Des cinétiques de croissance de cette lignée tumorale ont déjà été réalisées au sein du laboratoire et nous permettent de ne pas attendre d'effets néfastes observables sur les animaux dans les délais du protocole. Durant toute la période d'expérimentation, l'état général des animaux sera observé au moins trois fois par semaine et, en cas de souffrance ils seront traités par analgésiques ou euthanasiés. Les points d'appel seront les suivants :

- Signes de souffrance : prostration, dos vouté, nuque creusée, perte de poids de plus de 20% par rapport au poids antérieur le plus élevé
- Volume de tumeur supérieur à 250 mm³.
- Altération de la mobilité.

Un raffinement continu des pratiques d'expérimentation sera pratiqué. Les souris seront hébergées dans des cages enrichies (igloo, tunnel, bâton à ronger). Les animaux auront une phase d'acclimatation d'une semaine avant la réalisation de la première procédure. A la suite de celle-ci, un suivi clinique régulier avec cotation sur une grille de suivi sera réalisé afin de s'assurer du bon état général des animaux.

7750 Les matériaux polymères biocompatibles sont connus depuis plusieurs dizaines d'années en ingénierie tissulaire et en particulier pour leur usage en tant qu'implants orthopédiques. Pourtant, malgré leurs propriétés mécaniques comparables à celles de l'os cortical humain, certains polymères restent bioinertes c'est-à-dire qu'ils n'interagissent pas avec les tissus biologiques environnants. Or il est important qu'ils aient la capacité de promouvoir des réactions spécifiques favorables à l'interface implant-tissu receveur. Pour résoudre ce problème, plusieurs études se sont concentrées sur le

développement de composites à base polymère, en ajoutant des particules bioactives dans la matrice polymère. Les futurs dispositifs seront constitués d'une matrice polymère de poly-ether-ether-cétone (PEEK), chargée en particules d'alliages métalliques complexes (CMA). Il est absolument essentiel pour la suite du projet de s'assurer de la biocompatibilité de ce matériau composite. Un travail préliminaire a présenté des résultats encourageants et a d'ores et déjà permis de montrer une bonne biocompatibilité vis-à-vis des cellules. Mais il est crucial pour valider cette biocompatibilité et l'utilisation de ce matériau pour futur dispositif de procéder également à une étude sur un modèle animal, en chronique. Afin de choisir et limiter le nombre d'implants chez le gros animal (plus long et plus difficile à implanter), nous avons besoin dans un premier temps d'implanter un modèle murin sur un mois. Pour cela, nous proposons une étude prospective et comparative sur 18 rats, répartis en 3 groupes :

Groupe 1 : implantation dans l'os du tibia du cylindre de PEEK seul

Groupe 2 : implantation dans l'os du tibia cylindre de PEEK + 15 % de particules de CMA

Groupe 3 : implantation dans l'os du tibia cylindre de PEEK + 30 % de particules de CMA

Chaque rat recevra 1 échantillon différent (cylindre de 1 mm de diamètre et 1 mm de hauteur). La durée de l'implantation est fixée à un mois.

En parallèle, afin d'évaluer également l'impact de ces matériaux sur le tissu mou, chaque animal sera greffé en sous-cutané abdominal de 2 cylindres du même composé permettant ainsi d'étudier leur biocompatibilité tissulaire et leur réaction inflammatoire induite *in vivo*. Afin de vérifier l'innocuité du matériau, l'état général (comprenant les observances cliniques, des mesures pondérales et les paramètres biologiques) de chaque rat sera suivi et une étude histologique sera menée à la fin de l'étude.

1- Remplacement

Un travail préliminaire sur la biocompatibilité/toxicité vis-à-vis des cellules a été réalisé et est très prometteur. Ces tests *in vitro* ne représentent qu'une première estimation dans l'évaluation de la biocompatibilité du matériau. Ils ont l'avantage d'être des méthodes rapides et sensibles de criblage, mais malheureusement, ils ont peu de valeurs prédictives à long terme sur du tissu vivant. Le problème de la transposition des résultats obtenus *in vitro* à l'application en clinique humaine reste donc entier et les renseignements ultimes ne pourront être fournis que par l'étude des interactions hôte/biomatériau *in vivo* chez un modèle animal.

2- Réduction

Nous proposons un travail expérimental prospectif et comparatif pour lequel le nombre d'animaux utilisé (18 rats) est optimisé de façon maximale :

- chaque animal sera son propre contrôle
- chaque animal recevra 6 échantillons différents.

Ainsi, le nombre d'animaux éligibles est considérablement diminué.

3- Raffinement

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu) et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires si nécessaire) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent.

Des mesures très complètes de suivis cliniques et paracliniques seront menés selon les protocoles standards mis en place dans notre structure comprenant des points limites afin d'éviter toute souffrance de l'animal : variation du poids de l'animal, apparence physique externe, changement dans les comportements non provoqués et réponses comportementales aux stimuli externes.

7751 Le cancer pancréatique est l'un des cancers les plus redoutés. Il représente la cinquième cause de décès par cancer dans les pays occidentaux. Il est généralement diagnostiqué à un stade avancé et est résistant aux traitements conventionnels. Il est actuellement acquis que la plupart des cancers pancréatiques sont caractérisés par une vascularisation réduite et une production importante de matrice extracellulaire qui réduisent de manière très importante l'accessibilité des médicaments

anticancéreux à la tumeur. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ce type de cancer constitue donc un défi majeur. L'introduction des nano-médicaments en médecine, où le médicament est incorporé dans un matériau pour le transporter au site d'action, a révolutionné la formulation pharmaceutique en permettant l'émergence de nouveaux traitements avec une spécificité et une efficacité accrues. Ils permettent le transport spécifique de la molécule active à la cellule ou au tissu malade, évitant ainsi les effets secondaires perniciose sur les tissus sains et la protection de la molécule active vis-à-vis de la dégradation dans la circulation sanguine. Des systèmes nouveaux et originaux de transport de médicaments sont développés au sein de notre laboratoire. Les nanoparticules dont nous souhaitons tester l'efficacité anti-tumorale seront composées de différents polymères synthétiques biodégradables couplés à la gemcitabine qui est un traitement de première ligne dans le cancer du pancréas. On espère grâce à ces vecteurs améliorer l'adressage vers les cellules cibles et augmenter la concentration de la molécule active au niveau des cellules tumorales et ainsi augmenter l'efficacité thérapeutique du traitement. Des tests de criblage pharmacologique ont été mis en place *in vitro* sur un modèle original de sphéroïdes. C'est un modèle cellulaire en 3 dimensions, plus proche de la tumeur que les cultures cellulaires en monocouche, mimant son organisation et où l'hétérogénéité du microenvironnement peut être reconstituée par la présence de différents types cellulaires. Ce système permettra de tester l'activité anticancéreuse des nano-médicaments *in vitro* de manière plus performante et de réduire le nombre de nanoparticules testées *in vivo* par la suite. Le passage chez l'animal reste cependant indispensable car la distribution du médicament et sa toxicité éventuelle doivent être analysés dans un organisme entier pour tenir compte des mécanismes de défense et de métabolisation qui seront mis en place par l'organisme et qui ne peuvent pas être reproduit *in vitro* du fait de l'implication de nombreux systèmes biologiques. Nos études seront conduites sur un modèle de greffe orthotopique de cancer du pancréas obtenu par l'implantation dans le pancréas de cellules tumorales humaines bioluminescentes qui pourront être visualisées en imagerie. Ce modèle orthotopique, où la tumeur est située à son emplacement anatomique habituel, permet de développer des tumeurs proches de la pathologie observée chez l'homme. Dans un souci de réduction du nombre de souris utilisées et de raffinement, nous avons choisi un modèle expérimental qui utilisera l'imagerie par bioluminescence, ce qui permettra de détecter de manière non invasive la tumeur *in vivo*, de suivre au cours du temps son développement ou sa régression, ainsi que de suivre l'apparition des métastases. L'imagerie est un outil précieux permettant de réduire considérablement le nombre de souris utilisées dans le projet (d'un facteur 3 à 4) car elle permet un suivi longitudinal des tumeurs, chaque souris étant son propre contrôle. Les souris seront traitées avec les nanoparticules couplées à la gemcitabine et les traitements contrôles. Le bien-être des animaux sera pris en compte. Toutes les procédures seront pratiquées sous anesthésie et des analgésiques seront administrés en pré et post opératoire. Les animaux seront observés tous les jours et le développement de la tumeur et des métastases suivi par imagerie. L'étude sera stoppée si l'on observe l'atteinte de points limites précoces qui prendront en compte la taille de la tumeur et l'état général de la souris. Les animaux seront hébergés en groupe dans un environnement enrichi favorisant les comportements exploratoires et réduisant le stress. Nous prévoyons de tester 10 nanoparticules sur 5 ans et on estime à 860 souris le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet.

7752 Le cancer de l'ovaire est le septième cancer le plus fréquemment observé chez les femmes dans le monde, comme dans l'Union européenne. De plus, 90% des cancers de l'ovaire chez l'adulte sont des adénocarcinomes diagnostiqués à un stade avancé dans 70 à 80% des cas (stade III ou IV selon la classification FIGO), soit après dissémination péritonéale des foyers tumoraux. On parle alors de carcinomes péritonéales retrouvées chez 85% des patientes atteintes d'un adénocarcinome ovarien. Le traitement consiste en une chirurgie cytoréductrice la plus complète possible, et de la chimiothérapie. Celui-ci apporte rarement une guérison, mais il peut retarder la progression du cancer, diminuer les symptômes, prolonger et améliorer la qualité de vie des patientes.

Le marqueur diagnostique cellulaire du cancer épithélial ovarien (EOC) est la Mucine16 (MUC16), une glycoprotéine membranaire surexprimée dans ces cancers, ainsi que sa forme circulante, le CA125. Celui-ci est actuellement dosé grâce à un test immunofluorescent sur des prélèvements sanguins. Le dosage du CA125 est principalement utilisé pour le suivi de traitement. MUC16/CA125 présente des O-glycosylations anormales caractéristiques des cellules cancéreuses épithéliales. On

retrouve en particulier l'antigène Thomsen-Friedenreich (AgTF) qui est un disaccharide, marqueur spécifique des cancers épithéliaux.

Notre projet repose sur l'utilisation d'une protéine, Xerocomus Chrysenteron Lectin (XCL), présentant une interaction spécifique avec l'AgTF. Après sa liaison sur l'AgTF, le nanocontainer est internalisé rapidement dans les cellules cancéreuses et se retrouve localisé dans les endosomes tardifs/lysosomes. La résolution de la structure 3D de ce nanocontainer a montré qu'il était organisé sous forme homo-tétramérique générant une cavité interne importante. Ces propriétés nous ont conduits à développer cette protéine comme outil théranostique (thérapie couplée à l'imagerie). En effet, ce nanocontainer protéique peut être utilisé comme sonde en imagerie diagnostique ou en per-opératoire, et comme système de vectorisation de petites molécules thérapeutiques dans le traitement de l'EOC.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche *in vitro*, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées et des approches *in vivo*, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez lesquels des tumeurs cancéreuses sont transplantées. Les modèles *in vitro* ne recréent ni la diversité de l'environnement tumoral, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier la dissémination péritonéale et le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité du nanocontainer en imagerie et comme agent de vectorisation de molécules anti tumorales.

Parmi les approches *in vivo*, on distingue l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses injectées à des souris et l'implantation de tumeurs issues de patients. Les modèles de lignées cellulaires cancéreuses combinent les avantages de travailler avec des lignées cellulaires tumorales humaines (sources quasi-inépuisables et variées), en condition orthotopique (site d'injection correspondant à celui de la tumeur d'origine, présence du microenvironnement tumoral et développement spontanée de métastases) et en injection intrapéritonéale pour l'étude de la dissémination péritonéale. En revanche, les lignées ne reproduisent pas l'hétérogénéité des tumeurs de patientes qui elles conservent les caractéristiques cliniques. La limite de ces modèles de xénogreffes issues de tumeur de patientes est le temps nécessaire pour la prise tumorale ainsi que la réimplantation sous-cutanée qui ne permet pas de développement métastatique. Malgré tout, ces modèles permettent l'obtention d'une excellente corrélation entre les réponses obtenues et les réponses en clinique chez la patiente en question. Ils représentent donc un outil précieux pour l'évaluation préclinique de nouveaux agents thérapeutiques.

L'objectif de cette étude est de mettre en place des modèles de cancer épithélial ovarien chez la souris immunodéficente, pour permettre l'évaluation du nanocontainer protéique comme outil d'imagerie et agent de vectorisation *in vivo*. Quatre types de modèles seront développés :

- Modèle de carcinose péritonéale induite par l'injection intrapéritonéale de lignées cellulaires cancéreuses chez des souris immunodéficientes.
- Modèle orthotopique de lignées cellulaires cancéreuses chez des souris immunodéficientes, qui consiste en une implantation tumorale au niveau de son site anatomique d'origine. Ce modèle permet à la tumeur d'acquies un comportement invasif plus proche de la réalité clinique.
- Deux modèles de xénogreffes de tumeurs ovariennes provenant de patientes, chez la souris immunodéficente. Les fragments ou les cellules issues de ces derniers seront greffés par injection sous-cutanée ou intrapéritonéale, respectivement. La croissance tumorale des tumeurs implantées en sous-cutané sera suivie au cours du temps par mesure au pied à coulisse. Pour les fragments tumoraux dissociés implantés par injection intrapéritonéale, le suivi de la croissance tumorale sera réalisé par la technique non-invasive d'imagerie de fluorescence *in vivo*. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans

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

Le nombre de souris nécessaire à cette étude est de 1545, comprenant la mise au point des 4 modèles et l'évaluation du nanocontainer protéique comme outil d'imagerie et candidat médicament, en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

7753 La broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO) est une pathologie respiratoire chronique invalidante et très fréquente (3,5 millions de sujets adultes de plus de 40 ans en France). Cette pathologie respiratoire, caractérisée par un trouble ventilatoire obstructif non réversible, recouvre trois entités : la bronchiolite chronique obstructive, la bronchite chronique et l'emphysème. Elle conduit à une insuffisance respiratoire chronique sévère. Une inflammation et un remodelage tissulaire des bronches distales et des alvéoles pulmonaires sont les déterminants majeurs du déclin progressif de la fonction respiratoire.

Le principal facteur étiologique de la BPCO est le tabagisme ; cependant, il est désormais bien établi que certains facteurs professionnels sont à l'origine de la survenue ou de l'aggravation de la BPCO avec une fraction attribuable estimée à 15%. L'exposition pulmonaire à des aérosols particuliers complexes de silice (SiO₂), notamment dans le secteur du bâtiment et des travaux publics (BTP) ou de l'industrie d'extraction minière est l'un des facteurs étiologiques potentiellement incriminé dans la littérature. Parallèlement, des inquiétudes subsistent de façon générale quant aux effets potentiels sur la santé respiratoire des particules de taille nanométrique appelées « nanoparticules » (NP). Ces NPs représentent une fraction importante dans certains aérosols particuliers en milieu professionnel qu'ils soient produits de façon intentionnelle ou non intentionnelle ; dans ce dernier cas, les NPs sont alors appelées « particules ultrafines ». Dans la littérature, de très rares publications suggèrent que l'inhalation de particules de SiO₂ à de très fortes doses (environ 1g/kg) engendrerait une altération des petites voies aériennes et de l'emphysème chez le rat. A l'heure actuelle, il n'existe pas d'études expérimentales montrant des effets respiratoires des particules de SiO₂ à des doses réalistes représentatives de celles retrouvées en milieu de travail. Nous émettons donc l'hypothèse que des NPs de SiO₂ à des doses réalistes pourraient engendrer ou aggraver une BPCO.

Cette présente demande d'autorisation s'inscrit dans la continuité d'une demande antérieure concernant les effets respiratoires chez la souris d'expositions pulmonaires répétées à des NPs d'oxydes métalliques issues de fumées de soudage.

L'objectif de ce projet est d'étudier les effets pulmonaires chez la souris d'expositions pulmonaires répétées à des particules minérales fines et ultrafines de SiO₂ seules ou présentes dans les aérosols particuliers représentatifs retrouvés dans le secteur professionnel du BTP, comme par exemple dans le sable, le ciment, le béton, la brique ou les poussières de démolition. Des souris seront donc exposées par voie respiratoire à des particules fines et ultrafines de SiO₂ seules ou présentes dans des aérosols représentatifs. De plus, certaines souris seront également co-exposées à la fumée de cigarette (modèle de BPCO post-tabagique), ceci afin d'explorer une éventuelle aggravation de la BPCO ou de l'emphysème après une co-exposition comprenant des particules minérales fines et ultrafines de SiO₂ et de la fumée de cigarette. Une étude dose-réponse à des expositions répétées de particules fines et ultrafines de SiO₂ seules ou présentes dans ces types d'aérosols permettra de déterminer, d'une part, à partir de quel niveau de dose apparaît un risque de développer ou d'aggraver une BPCO et, d'autre part, d'apporter des arguments pour affiner les valeurs limites d'exposition professionnelle aux poussières dans le secteur du BTP et à la silice chez l'Homme.

Pour répondre à l'objectif, des prélèvements pulmonaires seront réalisés après l'euthanasie des animaux en vue de réaliser des analyses histologiques, morphométriques, minéralogiques (notamment en microscopie électronique couplé à une sonde EDX) et biologiques (cellularité, expression protéique et génétique, notamment de l'inflammation et de la fibrose pulmonaire).

Afin de respecter la règle des "3R", le projet prévoit le recours à :

- un nombre d'animaux aussi réduit que possible : 560 souris au total. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour étudier chaque groupe d'exposition et pour répondre à l'objectif de l'étude.

- un modèle animal ne pouvant pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets à explorer dans ce projet.
- une méthodologie comportant des critères d'interruption, comme il suit : Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences. Le poids sera mesuré tous les 3 jours. Afin d'enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. En cas d'apparition d'un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer.), l'animal sera euthanasié.

7754 Grace à un suivi à long terme d'une population de marmottes alpines (*Marmota Marmota*), notre projet vise à décrypter les réponses adaptatives de cette espèce face aux contraintes de son environnement. La marmotte a développé des stratégies évolutives originales lui permettant de coloniser la haute montagne, un environnement dont les caractéristiques climatiques sont en rapide évolution. Parmi ces stratégies, l'organisation en groupes sociaux revêt une importance capitale pour la survie des individus, et ce, dès les premières étapes de la vie. Nous avons notamment montré que certains paramètres de l'environnement néonatal tel que la composition de la portée ainsi que la structure des groupes familiaux au moment de la naissance affectent non seulement la survie juvénile mais également la probabilité d'accéder à la dominance et à la reproduction à l'état adulte. Les mécanismes physiologiques de cette « empreinte néonatale » sont largement méconnus mais pourraient impliquer un contrôle hormonal au travers la modulation de l'axe corticotrope une boucle de régulation au cœur de la réponse endocrine au stress. Notre hypothèse de travail repose sur l'idée que l'activité de l'axe corticotrope est façonnée par l'environnement néonatal et constituerait un lien mécanistique entre environnement néonatal et la performance des individus. L'objectif de ce protocole est d'établir un index de l'activité de l'axe corticotrope chez des marmottes juvéniles en implémentant un test fonctionnel *in naturae* sur des juvéniles capturés dans le cadre du suivi à long terme. L'activité de l'axe corticotrope sera mesurée en s'inspirant d'un test utilisé en routine en médecine humaine et en médecine vétérinaire et qui a déjà été appliqué chez de nombreuses espèces sauvage y compris chez la marmotte à ventre jaune. Ce test consiste à quantifier l'élévation transitoire des hormones de stress (corticostérone) dans le sang suite à stimulation de la glande surrénale par une injection d'ACTH (Hormone adrénocorticotrope). Pour réaliser ce test, les individus capturés seront préalablement tranquilisés par administration intramusculaire de zolétil. La procédure aura lieu dans une pièce chauffée au calme et à l'obscurité afin de limiter tout stress inutile. A l'issue de ce test, les individus seront ensuite relâchés à l'endroit exact de leur capture puis seront re-capturés annuellement pour suivre l'évolution des paramètres morphologiques, comportementaux et démographiques. Ce test sera appliqué pendant deux années consécutives sur des juvéniles de maximum 20 familles faisant l'objet d'un suivi démographique à long terme. Chaque famille comprend en moyenne 4 juvéniles. Pour établir des approches statistiques performantes (approche multivariée) et prendre en compte la variabilité environnementale et inter-individuelle, il est indispensable d'obtenir un grand nombre d'individus. Nous envisageons de manipuler au maximum 60 individus par an soit un maximum de 120 individus sur toute la durée du projet. Notre objectif étant d'étudier des processus naturels, tout est mis en œuvre pour réduire au maximum l'impact de notre étude sur les individus.

7755 La tuberculose (TB) est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Parmi les axes principaux de recherche dans cette pathologie figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la mycobactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin plus efficace que le vaccin actuel, le BCG. Notre équipe contribue à ces deux axes de recherche en tentant de comprendre les mécanismes de l'interaction hôte-pathogène dans cette pathologie, ce qui implique l'utilisation de modèles cellulaires et animaux d'infection par Mtb. Le présent projet vise à proposer une nouvelle stratégie vaccinale utilisant des vecteurs lentiviraux, stratégie qui a montré son efficacité et est utilisée en essai clinique chez l'homme dans d'autres situations infectieuses. Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (charges bactériennes) ainsi que des paramètres immunologiques (moléculaires et cellulaires). Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 390 (procédure 1) +1536 (procédure 2) soit 1926 souris C57BL/6. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 2 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, nous avons développé des approches

expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Ensuite, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de la vaccination intramusculaire; ii) lors de l'infection intranasale par Mtb et iii) lors du développement de la tuberculose. Les injections intra-nasales et intramusculaires seront réalisées sous anesthésie (isoflurane) et, dans le cas de l'injection intramusculaire, douloureuse, d'une analgésie (buprénorphine). Une surveillance journalière du stress et de la douleur au cours et suite à ces injections ainsi que lors de l'induction de la tuberculose expérimentale sera réalisée. Les points limites précoces choisis sont les changements dans l'aspect physique (attitude prostrée, poil terne), le comportement des animaux (isolement, déplacements limités) et la perte de poids (>15%).

7756 Quand il devient chronique et/ou excessif, le stress peut mener à des conditions extrêmes (burnout, dépression, anxiété, troubles de stress post-traumatique) qui, dans leurs expressions pathologiques, forment les troubles anxiodépressifs. Ils représentent les affections neuropsychiatriques les plus fréquentes et sont la cause la plus importante d'invalidité dans le monde. Sa prévalence a été multipliée par 6 depuis 1970 et d'après les études de l'Organisation Mondiale de la Santé, il s'agira de la famille de pathologies la plus coûteuse en 2030 (devant les maladies cardiovasculaires, les maladies infectieuses et les cancers). Ces troubles sont généralement traités par des pharmacothérapies basées sur l'administration chronique d'antidépresseurs, mais la proportion de patients résistants aux pharmacothérapies atteint des taux de 30-50%. Ainsi, les troubles anxiodépressifs sont un problème majeur de santé publique, nécessitant une meilleure compréhension des mécanismes neurobiologiques sous-jacents et la mise au point de nouvelles stratégies thérapeutiques plus efficaces. Un candidat qui suscite un fort intérêt est la neurogenèse adulte hippocampique (AHN). Le lien entre AHN, troubles anxiodépressifs et effets thérapeutiques semble causal étant donné que l'inhibition de l'AHN dans des modèles animaux augmente les comportements anxieux, la réponse au stress et empêche l'action comportementale des antidépresseurs. Malgré ces résultats, le rôle exact de l'AHN dans la rémission demeure mal compris.

Le but de cette expérience est d'évaluer l'action thérapeutique de la neurogenèse adulte sur les effets du stress chronique imprédictible (SCI) sur différents symptômes de la dépression et d'anxiété (évalués principalement par une batterie de tests comportementaux) et sur l'activation cérébrale. Ces évaluations et mécanismes ne peuvent être approchés qu'au travers de l'expérimentation animale, puisque nécessitant la manipulation de cellules souches cérébrales, d'animaux transgéniques et de l'utilisation de techniques d'immunohistochimie par exemple. Ces méthodologies ne peuvent donc être réalisées qu'au travers d'une approche préclinique.

Quatre lots de 15 souris seront nécessaires pour chaque étape de l'expérience, pour un maximum de 7 étapes (n = 420) :

- Une première étape pour identifier quels symptômes (parmi 6) sont affectés par le SCI et par l'augmentation de la neurogenèse adulte,
- Puis 6 étapes (maximum) de mesures de l'activation cérébrale associée à chaque symptôme (ce nombre est dépendant des résultats de l'étape 1 – l'activation cérébrale sera évaluée uniquement sur les symptômes répondants lors de l'étape 1).

En application de la règle des 3 R au modèle utilisé dans l'étude :

Raffinement : les stress appliqués aux animaux peuvent être qualifiés de léger à moyen, sans stress physique de type nociceptif. Les conditions d'élevage des animaux non stressés seront optimales au regard des normes en vigueur avec enrichissement du milieu (cabanes plexiglass et cartons, tubes).

Remplacement : aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée. Les effets du stress chronique et ses symptômes chez l'animal, comme modèle de pathologie psychiatrique humaine, repose sur l'observation du comportement de l'animal vivant. L'étude de l'activation cérébrale et de l'implication des réseaux et circuits neuronaux sous-jacents

nécessite un animal vivant. Aucun marqueur cellulaire *in vitro* n'est disponible pour ce type d'étude. Les dosages biologiques requièrent des prélèvements frais.

Réduction : les effectifs sont optimisés pour une puissance statistique satisfaisante (déterminé sur expériences préliminaires et variabilité interindividuelle dans les tests utilisés), ainsi les observations nécessitent une taille d'effectif de 15 sujets par groupe. De plus, la rationalisation des procédures permet d'optimiser l'utilisation des échantillons cérébraux prélevés.

7757 Les biofilms bactériens sont généralement définis comme des agrégats de cellules bactériennes attachés à une surface et enrobés d'une matrice visqueuse. La formation d'un biofilm se fait selon un modèle bien établi et suit différentes étapes (adhésion, croissance, maturation et dispersion). On estime que 80 % de la biomasse microbienne de notre planète réside sous forme d'un biofilm. Le biofilm protège les bactéries et leur permet de survivre dans des conditions environnementales hostiles. Les bactéries du biofilm peuvent résister à la réponse immunitaire de l'hôte et sont beaucoup plus résistantes aux antibiotiques et aux désinfectants que les cellules bactériennes planctoniques (non adhérentes). Ainsi, la présence de biofilm dans les infections est particulièrement redoutée en clinique (ex : sondes de ventilation mécanique, prothèses, cathéters veineux...). Parmi les espèces bactériennes largement retrouvées dans les biofilms figurent les espèces du genre *Staphylococcus* sp.

Le but de notre projet est de tester l'efficacité de la fosfomycine sur la capacité à inhiber l'installation d'un biofilm à *Staphylococcus aureus* dans un modèle *in vivo* d'infection sur cathéter chez la souris BALB/c. Deux souches seront testées et au total 156 animaux utilisées.

Un gros travail a été réalisé *in vitro* sur l'efficacité de plusieurs antibiotiques dont la fosfomycine sur des modèles de biofilm précoce et mature. Toutefois, l'efficacité des antibiotiques *in vivo* peut s'avérer très différente de celle obtenue *in vitro* et les prédictions sont d'autant plus difficiles dans ces modèles de biofilm. De ce fait, le recours à une étude dans un modèle animal est nécessaire pour valider les hypothèses avancées *in vitro*.

L'hébergement des animaux sera pratiqué dans un milieu enrichi, le nombre d'animaux a été réduit à 7 souris par groupe au lieu de 10 compte tenu des expériences précédentes menées au laboratoire et la procédure chirurgicale a fait l'objet de différentes mises au point, permettant d'optimiser le temps et la récupération des animaux. La pose de cathéter se fait sous anesthésie générale. Les souris reprennent une activité normale dès leur réveil et ne présentent pas de signes de souffrance particuliers. Par ailleurs, il s'agit d'une infection très localisée et en aucun cas une infection systémique n'est anticipée. Dans le cas où un animal présente des signes de souffrance importants (immobilité, perte de poids >20%, pilo-érection), il sera mis à mort comme cité précédemment

7758 Les études actuelles montrent que l'épidémie d'obésité atteint un niveau très alarmant. Si l'obésité est un réel problème de santé publique, générant une diminution de l'espérance de vie en raison des maladies qu'elle entraîne (hypertension, cancers, diabète...), elle est également associée à une diminution de la qualité de vie avec en particulier des effets délétères sur la mémoire. C'est d'autant plus problématique pendant l'enfance et l'adolescence qui représentent des périodes de maturation de certaines structures du cerveau indispensables pour la mémoire comme l'hippocampe. Notre équipe a en effet mis en évidence chez la souris que la consommation d'une nourriture hyperlipidique (HL) pendant l'adolescence, en plus d'entraîner un surpoids, perturbe certaines molécules, les endocannabinoïdes, au sein de l'hippocampe et que cela participe aux altérations de la mémoire. L'objectif du présent projet est de mieux comprendre le rôle des endocannabinoïdes de l'hippocampe dans les perturbations de la mémoire induites par la consommation d'une nourriture HL pendant l'adolescence chez la souris.

Pour cela des souris seront exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou standard avant de réaliser un test comportemental simple et non aversive permettant d'évaluer la mémoire (la reconnaissance d'objet). Rapidement après le test de mémoire les souris seront anesthésiées, sacrifiées et l'hippocampe sera prélevé dans le but d'évaluer si les souris HL présentent des activations cellulaires différentes au sein de l'hippocampe suite au test de mémoire (lot 1). Si des activations différentes sont observées chez les souris HL il s'agira de déterminer si cela dépend des endocannabinoïdes. Pour cela des souris exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou

standard recevront une injection périphérique d'un bloqueur des endocannabinoïdes juste avant de réaliser le test de mémoire. Elles seront alors anesthésiées et sacrifiées afin d'évaluer l'impact de ce blocage sur les activations cellulaires de l'hippocampe (lot 2). De plus si des activations différentes sont obtenues chez les souris HL il s'agira d'évaluer si le blocage des molécules activées améliore la mémoire des souris HL. Pour cela des souris exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou standard recevront une injection périphérique d'un bloqueur spécifique des molécules activées juste avant de réaliser le test de mémoire (lot 3). Les endocannabinoïdes peuvent agir sur différentes cellules de l'hippocampe. Nous essaierons donc, en parallèle des expériences précédentes, d'identifier sur quels types cellulaires de l'hippocampe agissent les endocannabinoïdes pour engendrer les effets du régime HL sur la mémoire. Pour cela des souris exposées pendant 12 semaines à une nourriture HL ou standard subiront une chirurgie stéréotaxique permettant d'intervenir spécifiquement sur certaines cellules de l'hippocampe afin de modifier les récepteurs aux endocannabinoïdes (lot 4) ou l'activité cellulaire (lot 5). Quelques semaines après, les souris réaliseront le test de mémoire afin d'évaluer les potentiels effets bénéfiques de la chirurgie.

L'étude intégrée des effets de la nutrition sur des aspects comportementaux et de fonctionnement cérébral est permise grâce à l'utilisation du modèle de rongeur soumis à de la nourriture obésogène et il n'est pas possible de le remplacer par des approches cellulaires. Les tests comportementaux utilisés (reconnaissance d'objet) ne présentent aucune manipulation douloureuse puisqu'ils font appels à des comportements innés chez les rongeurs. Les souris seront hébergées tout au long de leur vie en cage collective avec un environnement enrichi dans une animalerie agréée comportant une régulation de la température, de l'hygrométrie et du cycle jour/nuit. Elles recevront de l'eau et de la nourriture à volonté, elles seront changées régulièrement et elles seront observées tous les jours de la semaine et pesées 1 fois par semaine par un personnel qualifié. Au cours de ces observations, si un animal présente des blessures, elles seront immédiatement soignées et l'animal sera surveillé deux fois par jour. Si un animal présente un comportement anormal traduisant un état de mal être (perte de poids, poils hérissés, prostration...), il sera immédiatement isolé et surveillé. Si l'animal ne montre pas d'amélioration significative, il sera sacrifié dans les 48h. Les chirurgies seront réalisées sous anesthésie générale avec administration d'analgésiques en pré- et post-opératoire pour limiter la douleur. En minimisant le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des résultats concluants et permettre des comparaisons statistiques fiables, nous estimons que 10 souris par groupe seront nécessaires pour mener à bien le projet. Cela représente un total de 260 souris sur 2 ans. Ces expériences devraient permettre une meilleure compréhension des effets d'une nourriture HL sur le cerveau et la mémoire en identifiant certains mécanismes afin d'envisager potentiellement à plus long terme des stratégies thérapeutiques.

7759 Le but de ce projet est d'étudier la survenue des troubles du rythme et d'évaluer le substrat arrythmogène cardiaque dans le cadre de la pathologie de la Dystrophie Musculaire de Duchenne. Il s'agit de la dystrophie musculaire la plus fréquente. Elle se caractérise par une faiblesse musculaire progressive sévère associée à une insuffisance cardio-respiratoire, la cardiomyopathie étant aujourd'hui la cause principale des décès. Pour cela, une approche chirurgicale par cathétérisme intracardiaque sera réalisée chez le rat DMDmdx, nouveau modèle animal pour la pathologie de la Dystrophie Musculaire de Duchenne présentant, comme le patient myopathe, une perte d'expression de la protéine dystrophine. Ce projet permettra de valider ce modèle pour l'étude électrophysiologique cardiaque en vérifiant l'hypothèse de la survenue de troubles du rythme de nature comparable à ceux retrouvés chez le patient. Si ces observations sont confirmées, nos investigations porteront sur l'étude du substrat arrythmogène responsable de ces phénomènes ainsi que sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Afin de suivre la règle des 3R :

- Réduction : Le nombre d'animaux par groupe a été évalué pour être un minimum (10 animaux par groupe) permettant d'assurer la robustesse des résultats. Une étude statistique sera réalisée. Ainsi un test de Student sera utilisé pour un nombre d'individus inférieur à 30 par condition si les variances sont égales. Si ce n'est pas le cas, un test non paramétrique de Mann Whitney sera effectué.
- Raffinement : Des protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place en fonction des procédures expérimentales.

L'évolution de la maladie en elle-même pouvant entraîner de la souffrance, l'état général de chaque animal sera surveillé pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liée à l'expression clinique de la maladie, et éventuellement anticiper l'euthanasie de l'animal.

- Remplacement : Aucun autre modèle ne peut remplacer à ce jour l'animal dans ces investigations de screening pharmacologique concernant le développement de nouvelles molécules thérapeutiques. Ce projet de caractérisation cardiaque du rat DMDmdx nous permettra à terme de réaliser l'évaluation préclinique de traitements potentiels de la DMD dans un modèle animal adapté, et donc de raffiner le nombre d'animaux utilisés dans ces futurs projets.

L'ensemble du projet nécessitera au total 50 animaux afin de répondre aux objectifs posés pour ce projet. : 10 animaux pour l'apprentissage des procédures, 20 animaux âgés d'un mois et demi et 20 autres âgés de 7 mois. Ce second volet expérimental ne sera conduit que si le premier à l'âge d'un mois et demi est réalisé avec succès.

7760 Parmi les tumeurs du cerveau, le médulloblastome est la tumeur maligne la plus fréquente dans la population pédiatrique, représentant 25 % des tumeurs cérébrales de l'enfant et reste relativement rare chez les adultes. Elle se caractérise par une hétérogénéité importante sur le plan histologique et moléculaire qui permet de définir actuellement 4 sous-groupes de médulloblastome. Le traitement standard actuel comprend la chirurgie, la chimiothérapie et /ou radiothérapie, parfois associés à une chimiothérapie à haute dose suivie d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Bien que ces traitements améliorent la survie, les chances de guérison restent faibles, en particulier pour les formes à haut risque (métastases initiales, résidu post chirurgical, certaines mutations) en raison de récurrences ou de métastases dans, voire en dehors du système nerveux central. Les séquelles à long terme du traitement sont encore dramatiques (neuro-intellectuelles et endocriniennes) et la qualité de vie de ces patients est le plus souvent mauvaise. Par conséquent associer une thérapie biologique ciblée aux stratégies habituelles de traitement du médulloblastome est d'un intérêt considérable. Actuellement, les thérapies ciblées telles que les anticorps monoclonaux ou l'immunothérapie adoptive connaissent un véritable essor. Le développement de modèles animaux pertinents qui reproduiront la pathologie humaine est donc indispensable pour comprendre la biologie de la tumeur, développer et évaluer ces nouvelles thérapies ciblées moins toxiques. L'un des défis dans le traitement de médulloblastome est la présence de la barrière hémato-encéphalique limitant l'accès au site de la tumeur et protégeant la tumeur de la surveillance du système immunitaire. Cependant, ce concept a été récemment révisé car il a été démontré que les cellules immunitaires, et plus particulièrement les cellules Natural Killer (NK) pouvaient infiltrer les tumeurs cérébrales et jouer un rôle dans l'immunité anti-tumorale. Les cellules Natural Killer (NK) sont un sous-ensemble de lymphocytes capables de lyser directement les cellules infectées ou transformées sans immunisation préalable. La cytotoxicité des cellules NK peut s'exercer de manière naturelle via un équilibre entre différents signaux qui vont soit activer soit inhiber la cellule NK ou de manière dépendante des anticorps. Ainsi, les cellules NK jouent un rôle important dans l'immunité anti-tumorale avec une relation claire entre la surveillance des cellules NK, l'activité anti-tumorale et la signification pronostique dans différents types de cancers. Le potentiel anti-tumoral des cellules NK envers certaines tumeurs cérébrales a été démontré *in vitro* et *in vivo*. Cependant, très peu d'études ont été publiées sur le médulloblastome et plusieurs questions restent en suspens concernant l'efficacité des cellules NK dans ce contexte spécifique. Actuellement, il n'existe pas de modèle animal d'immunothérapie par cellules NK dans le cadre du médulloblastome et malheureusement, le microenvironnement tumoral joue un rôle important dans le développement tumoral et dans la réponse aux agents thérapeutiques et par conséquent à l'heure actuelle nous ne pouvons remplacer les modèles *in vivo* par des approches alternatives (Remplacement). Afin de déterminer l'intérêt thérapeutique des cellules NK dans ce contexte nous souhaitons : - Analyser le devenir des cellules NK *in vivo* après leur administration, par détection sur des coupes histologiques et/ou par cytométrie en flux après dissociation tumorale - Mesurer la réponse au traitement par cellules NK dans les groupes de souris concernées. Cependant si lors de l'étude de domiciliation des cellules NK, le nombre de cellules NK n'est pas suffisant, la suite des expérimentations sera abandonnée (Réduction). Le projet utilisera au total 66 animaux pour l'étude de domiciliation et l'étude d'efficacité anti-tumorale. Finalement, le choix de points limites relativement précoces par rapport à l'évolution de

la pathologie en tenant compte notamment du volume des tumeurs permettra un arrêt éthiquement acceptable des expérimentations (Raffinement).

7761 Notre travail se base sur l'hypothèse que les tumeurs évoluent et progressent de manière incontrôlée lorsque les réponses immunitaires anti-cancéreuses échouent. Une immuno-surveillance naturelle influence clairement la progression du cancer du sein humain parce que le pronostic des patients est dicté par la densité, la composition et l'activité de l'infiltré immunitaire de la tumeur au moment du diagnostic.

De même, il a été prouvé que l'efficacité des agents anticancéreux classiques et ciblés n'est pas seulement due à des effets cytostatiques/cytotoxiques directs, mais repose également sur la (ré) activation des réponses immunitaires anti tumorales ciblées. La chimiothérapie peut favoriser ces réponses en augmentant l'immunogénicité des cellules malignes, ou en inhibant les circuits immunosuppresseurs qui sont établis par le développement de néoplasmes.

Compte tenu de ces arguments, l'objectif principal de ce projet est de déterminer un éventuel effet anti-tumoral des différentes chimiothérapies dites immunogènes afin de mieux comprendre leur mécanisme d'action ainsi que l'implication du système immunitaire dans ce processus. Pour ce faire, nous prévoyons de tester l'augmentation de la sécrétion de HMGB1 (High Mobility Group Box 1) par 7 molécules chimiques choisies par criblage *in vitro*. Il est indispensable à ce stade d'étudier pour valider éventuellement l'activité de ces molécules dans un organisme vivant entier reproduisant toutes les interactions immunitaires et humorales entre les tissus. En effet, il est actuellement impossible de reconstituer un système immunitaire *in vitro/ ex vivo* du fait de sa complexité.

Nous avons choisi le modèle souris car notre projet s'applique à étudier l'implication du système immunitaire dans la lutte anti cancéreuse chez le mammifère. La souris est le mammifère le plus facile et le plus utilisé en expérimentation animale (suffisamment petit pour en avoir un certain nombre, facile à manipuler, et suffisamment grand pour pouvoir avoir des injections de cellules tumorales). Ce projet nécessitera au maximum 1408 souris immunocompétentes.

Ce projet sera d'une durée prévue de 3 ans. Il prévoit des expériences de croissances tumorales chez la souris, la mesure de croissance des tumeurs et de l'impact des molécules testées. Dans un souci concret de réduction, les expérimentations seront regroupées au maximum afin de réduire le nombre d'animaux témoins. Nous pourrions être amenés à utiliser moins de souris si l'effet observé s'avère significatif au cours des premières expériences. L'étude sera arrêtée si l'expérience initiale invalide l'hypothèse de travail. De plus, les manipulations seront réalisées dans le souci constant de réduire au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux. Toutes les procédures expérimentales seront effectuées sous anesthésie, des points limite précoces seront appliqués strictement et les animaux bénéficieront en tout temps d'un enrichissement environnemental (« cocoons » et maisons en carton).

7762 Ce projet vise à développer des modèles de rongeurs équipés de manière permanente (par technique chirurgicale) de dispositifs permettant soit la libération de substance à tester, soit l'identification des animaux, soit la mesure de paramètres biologiques. Une fois implantés et après un suivi clinique pendant la période de récupération, les animaux sont expédiés vers les établissements utilisateurs.

2 types d'implants peuvent être utilisés :

-Des implants qui libèrent une substance de manière continue dans l'organisme, de quelques jours à plusieurs semaines. La libération du produit se fait soit localement, soit à distance via un cathéter connecté à l'organe cible. Ces implants sont utilisés dans les études de toxicologie ou de métabolisme avec l'avantage de ne plus requérir l'intervention répétée du manipulateur sur les animaux, ce qui contribue au raffinement

-Des implants miniaturisés électroniques. Ces équipements sont placés sous la peau ou dans l'abdomen. Ils transmettent par ondes radio des données d'identification, ou permettent le suivi, la mesure et l'enregistrement de différents paramètres biologiques (ex : fréquence cardiaque, mouvements, pression artérielle). L'identification des animaux utilisés peut être réalisée par la pose de puces électroniques implantées sous la peau. Ces dispositifs évitent toute erreur possible quant à l'identification de l'animal renforçant ainsi la robustesse et la fiabilité des études.

Les animaux utilisés sont hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre ou au poids, ils évoluent dans un milieu enrichi.

Les chirurgies sont réalisées selon des procédures standardisées et adaptées aux spécificités de souche, sexe, âge et poids. Le bien-être animal est une priorité : l'injection d'un analgésique en péri-opératoire est réalisée pour contrôler la douleur. Toutes les interventions sont réalisées sur animaux anesthésiés, qui sont préalablement préparés de manière aseptique pour l'intervention. Les soins post-opératoires sont réalisés sur les animaux avec un suivi clinique et l'administration d'antidouleur. Les points limites sont définis en fonction des spécificités du modèle. Les animaux sont observés tous les jours. Basé sur l'analyse des données de notre activité des 5 années précédentes, nous estimons utiliser pour l'ensemble du projet (5ans) 1500 animaux (soit 1250 rats et 250 souris).

7763 La Bretagne est un des plus riches gisements d'algues au monde, unique en Europe, avec près de 600 espèces répertoriées et plus de 300 000 tonnes valorisables annuellement. Parmi elles, certaines macro-algues contiennent des molécules dotées de qualités nutritives et sanitaires. Dans le cadre d'un projet de recherche, des molécules extraites de différentes familles d'algues ont tout d'abord été sélectionnées *in vitro* pour leurs activités immunostimulantes et l'innocuité de ces extraits par voie alimentaire a ensuite été testée sur des porcelets. Afin d'estimer si deux extraits d'algues de composition saccharidique déjà évalué auparavant *in vivo* pour leur innocuité, ont un impact sur la réponse immunitaire chez le porc, un essai expérimental sera réalisé sur des porcelets. L'état de santé des porcelets sera évalué après une phase d'alimentation de deux semaines, au moment du sevrage, avec des aliments renfermant des extraits d'algues puis à l'issue de ces deux semaines, pendant 3 semaines supplémentaires après l'épreuve infectieuse par le circovirus porcin de type 2 (PCV2). Le PCV2 est l'agent viral responsable de la maladie d'amaigrissement du porcelet affectant les porcelets en post-sevrage. L'infection par le PCV2 a de lourdes conséquences économiques en production porcine. En comparaison d'animaux témoins dont l'aliment ne sera pas supplémenté avec des composés algaux, l'état de santé de porcs alimentés par les deux extraits d'algues aux propriétés immunostimulantes sera évalué de manière globale aux travers d'examen cliniques quotidiens, d'un suivi des performances zootechniques (gain moyen quotidien, consommation alimentaire, contrôle de signes cliniques avec échelle de notation) et de prélèvements biologiques.

Notre procédure expérimentale sera menée dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique (nombre total utilisé : 24 porcs), mesures de raffinement qui viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés). En ce qui concerne le remplacement, il n'est pas envisageable, les animaux utilisés étant nécessaires pour évaluer l'impact des extraits d'algues sélectionnés pour leurs propriétés immunostimulantes sur la réponse immunitaire mise en place après une infection virale spécifique du porc.

7764 Au cœur du noyau des cellules, l'ADN, constitué des bases A, T, G et C, fournit le support de notre information génétique. Sa compaction en chromatine est indispensable pour pouvoir organiser cette longue molécule dans chaque noyau. Aussi, cette structure n'est pas statique et sa dynamique impacte directement l'expression des gènes. L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, qui comprend de l'ADN enroulé autour de protéines appelées histones. Ces histones se regroupent en quatre grandes familles distinctes. Chaque type d'histone peut jouer un rôle sur la fonction du nucléosome, ce qui pourra modifier l'expression de gènes. De nouvelles études ont mis en évidence l'implication de mutations de ces histones dans des formes de cancer très agressif, comme les glioblastomes pédiatriques. Ainsi, il est devenu déterminant de comprendre comment ces histones, en tant que constituants élémentaires de l'organisation du génome en chromatine, contribuent à des fonctions cellulaires critiques au cours du développement et dans des situations pathologiques.

Le projet proposé concerne l'analyse des histones et de leur partenaire au cours du développement. Le projet utilisera des embryons de *Xenopus laevis* afin de combiner des techniques classiques de manipulations d'embryons avec des analyses moléculaires sophistiquées.

Avantages et dommages escomptés

L'amphibien *Xenopus laevis* est un organisme modèle pour l'étude des processus développementaux chez les vertébrés. Les études réalisées à partir de ce modèle permettent de mieux comprendre les

processus développementaux des modèles mammaliens dont l'homme. L'analyse du génome de *Xenopus* montre d'importantes similitudes avec le génome humain, notamment 79% des gènes identifiés dans des maladies humaines ont leur équivalent chez *Xenopus*. L'utilisation de ce modèle permet d'associer aux approches d'embryologie classique, de biochimie et de biologie cellulaire, des études à large échelle de l'expression des gènes et des analyses pharmacologiques.

Etant donné que l'essentiel des expériences que nous réalisons s'effectuent aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome, les dommages escomptés sont extrêmement limités.

Nombre et types d'animaux à utiliser sur 5 ans.

Afin d'obtenir les embryons nécessaires à nos expérimentations durant les 5 années du projet, nous anticipons d'utiliser au maximum 200 xénopes femelles sauvages adultes qui seront périodiquement stimulées par injection d'hormone (human Chorionic Gonadotropine, hCG recombinante ou Gonadotropine pregnant mare) selon les protocoles standard.

Les animaux utilisés seront ensuite mis au repos durant 6 mois.

Conformité avec les exigences 3R

Le vertébré tétrapode non mammifère *Xenopus laevis* répond idéalement aux recommandations des 3R. Le choix du modèle et des pratiques expérimentales repose sur les propriétés suivantes :

i) Un grand nombre d'embryons (plusieurs milliers) sont obtenus par fécondation *in vitro* à partir d'un nombre limité d'individus adultes, permettant à plusieurs expérimentateurs de travailler simultanément,

ii) une estimation de la variabilité inter-individuelle naturelle (animaux sauvages non sélectionnés) et une analyse statistique immédiate des résultats obtenus.

iii) Le développement externe des embryons permet une observation non-invasive.

iv) De nombreuses expériences peuvent se restreindre aux stades embryonnaires antérieurs à la forme larvaire autonome.

v) L'amphibien *Xenopus laevis* possède une longévité (20 ans) et une période de reproduction (15 ans) remarquables, ce qui en fait un excellent modèle pérenne pour les études d'ordre génétique.

vi) Les femelles utilisées dans les expériences impliquant une fécondation *in vitro* peuvent être induites à pondre plusieurs fois en respectant un intervalle de 6 mois entre chaque ponte, minimisant le stress potentiellement engendré.

Toutes ces caractéristiques minimisent significativement le nombre d'animaux nécessaires au projet, sans compromettre ses objectifs scientifiques. Au contraire, notre projet explore des étapes du développement qui ne pourraient pas être abordées aussi efficacement et simplement dans un modèle mammifère avec un développement intra-utero.

7765 En 2012, le cancer du côlon fait partie des quatre cancers les plus fréquents avec le cancer de la prostate, du poumon et du sein. Il représente la deuxième cause de mortalité chez l'homme et la troisième chez la femme. Actuellement le traitement du cancer colorectal repose sur l'utilisation du 5-Fluorouracile administré en association avec d'autres chimiothérapies telles que l'Oxaliplatine. Bien que ces chimiothérapies aient un effet anti-tumoral avéré, elles ne conduisent pas systématiquement à une rémission totale du patient, en particulier dans les cas de cancers avancés. De plus il est fréquent que le cancer du côlon ne soit détecté que tardivement ce qui fait de la prévention un objectif essentiel. Un autre paramètre concerne les patients avec prédisposition génétique chez qui il existe un très haut risque de survenue de cancer colique. Dans tous ces cas il serait donc intéressant de développer un traitement prophylactique efficace et qui pourrait, par la même occasion, améliorer l'action anticancéreuse des chimiothérapies actuelles. Le but du projet est d'évaluer l'efficacité anti-tumorale d'un médicament appelé produit B administré en prophylactique dans un modèle de cancer du côlon chez la souris. Pour cela nous travaillerons avec le modèle tumoral CT26 qui est une lignée cellulaire d'adénocarcinome colique murin dérivée de souris Balb/c. Nous réaliserons un suivi de la croissance tumorale des animaux qui auront été traités ou non avec le produit B. L'efficacité anticancéreuse du produit B sera ensuite comparée à la double chimiothérapie Folfox (5-Fluorouracile

+ Oxaliplatine) couramment utilisée pour le traitement du cancer colorectal chez l'homme. Ceci permettra de rendre compte de l'efficacité de ce traitement dans ce modèle par rapport à une chimiothérapie standard. Comme il a été montré que le système immunitaire peut contribuer à l'élimination des cancers, nous étudierons l'état d'activation de cellules immunitaires chez les souris non traitées et traitées. Le nombre total de souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet est de 240. La mise en place de ce projet s'est attachée à respecter la règle des 3R. Tout d'abord, les expériences ne seront répétées que deux fois et réalisées dans un seul modèle de cancer ce qui permet donc de réduire le nombre d'animaux de l'étude. L'étude de l'effet du produit B sur des cellules immunitaires in vitro permet de s'affranchir de l'utilisation d'animaux non justifiée (remplacement). Enfin, la totalité des procédures impliquant les animaux (injection sous-cutanée) est réalisée sous anesthésie afin de réduire l'inconfort potentiel à son minimum permettant ainsi le raffinement de l'étude.

7766 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporale (DFT) sont deux maladies neurodégénératives progressives et fatales qui constituent les deux extrêmes d'un continuum génétique, clinique et histo-pathologique. En effet, environ 20% des patients atteints de SLA développent une DFT et réciproquement. A ce jour, en dehors de traitements symptomatiques peu efficaces, aucun traitement curatif n'est disponible pour ces pathologies lourdes. L'identification et la compréhension des mécanismes communs à ces deux pathologies ou spécifiques à chacune d'entre elle est un enjeu majeur pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques et la prise en charge optimale des patients. Ce projet de recherche a pour objectif d'identifier ces mécanismes moléculaires communs ou spécifiques qui conduisent soit à la SLA soit à la DFT ou sont mis en jeu dans les deux pathologies. Pour cela, nous utiliserons deux lignées de souris transgéniques : l'une modélisant la SLA et l'autre modélisant à la fois la SLA et la DFT. L'obtention de tissus à différents stades du processus de développement de ces deux versants d'une même pathologie est nécessaire à l'élucidation des processus qui les sous-tendent. Pour cela après prélèvement des tissus d'intérêt (cerveau, moelle épinière, muscles, tissu adipeux, foie, sang) nous utiliserons des techniques complémentaires de biologie moléculaire, de biochimie et d'histologie. Ces études permettront de mieux comprendre les mécanismes mis en œuvre précocement et d'identifier des cibles thérapeutiques adaptées à l'ensemble du continuum physiopathologique ou plus spécifiquement ciblées sur la SLA ou la DFT. Dans ce projet, nous utiliserons au maximum 1118 souris sur 5 ans.

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles afin de réduire le nombre d'animaux utilisés et d'améliorer et raffiner leurs conditions de vie. Réduction : Afin de réduire le nombre d'animaux, à chaque fois que cela sera possible l'ensemble des tissus mentionnés précédemment sera prélevé et utilisé en parallèle pour les différentes techniques d'analyse (exemple : muscle tibial droit : préparation d'ARN et de protéines; muscle tibial gauche : histologie). Le nombre de souris incluses dans le projet est lié de la nature des tests statistiques utilisés lors de l'analyse des résultats et tient compte de la variabilité interindividuelle de ces modèles. Les tests statistiques utilisés seront le test t de Student (non apparié) pour la comparaison de deux groupes expérimentaux ou des tests de comparaison de variance (ANOVA) suivis d'un test de Tukey pour la comparaison de plus de deux groupes expérimentaux. Raffinement : L'enrichissement de l'environnement des animaux, le maintien des interactions sociales et la surveillance quotidienne des animaux permettront de détecter rapidement tout changement de comportement, de limiter la souffrance des animaux si elle devait apparaître, et de s'assurer de leurs bien-être. Remplacement : La sclérose latérale amyotrophique et la démence fronto-temporale sont deux maladies complexes d'origine multifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante la complexité de ces pathologies et de leur mise en place progressive. Nous avons donc besoin de recourir à des modèles animaux pour réaliser ce projet de recherche.

7767 Plusieurs études montrent que les polyphénols extraits de plantes ont des effets bénéfiques sur diverses fonctions physiologiques chez différentes espèces. Cependant, les mécanismes moléculaires ne sont pas clairement élucidés.

Notre projet a pour but de déterminer l'influence des extraits de pépins de raisin et de thé vert riches en polyphénols sur le métabolisme (poids, engraissement, paramètres plasmatiques), les

performances de ponte (nombre et qualité des œufs), la fertilité (mortalité embryonnaire, taux d'éclosion) et les performances de la descendance (indice de consommation, viabilité des poussins) chez la poule reproductrice. Dès le démarrage (1 jour d'âge) les poussins femelles divisées en trois lots (n=100 animaux par lot) seront nourris dans les conditions d'élevage classique avec une supplémentation de 1% d'extraits de pépin ou de thé vert pour deux des lots, le troisième étant non supplémenté (témoin). La période de l'essai expérimental sera de 1 jour à 35 semaines d'âge. A 25 et 30 semaines d'âge, l'ensemble des poules (n=300) sera inséminé artificiellement avec du sperme issu de coq de même type génétique et d'élevage classique (n=54 coqs). Les œufs seront collectés pendant 3 semaines consécutives avec mise en incubation régulière après 7 jours de collecte. La fertilité, la mortalité embryonnaire (précoce et tardive) et le taux d'éclosion seront enregistrés au couvoir. Après éclosion, les poussins (un total d'environ 4535 poussins pour les 3 lots) seront élevés collectivement jusqu'à 10 jours d'âge afin d'évaluer l'impact du traitement alimentaire des mères sur les performances des poussins (mortalité, croissance et consommation d'aliment). L'effectif total des animaux utilisés dans le protocole est de 4889 mais seulement 300 animaux seront soumis à la procédure expérimentale. La règle des 3R a été respectée comme suit : Remplacer : Pour évaluer les réponses physiologiques telles que l'évolution du poids, l'engraissement, la performance de ponte et la fertilité, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté est la poule et le poussin dans notre protocole. Réduire : Des analyses statistiques ont été réalisées afin de réduire au maximum le nombre d'animaux. Ces analyses ont pris en compte les résultats d'un précédent protocole.

Raffiner : Les poules sont élevées au sol dans des conditions d'élevage classique. Les animaux peuvent se voir. Les enrichissements mis en place sont essentiellement des blocs à piquer et des objets suspendus.

7768 L'allergie alimentaire est devenue un sujet de première importance dans le domaine de la sécurité alimentaire, illustré notamment par l'augmentation importante du nombre d'articles publiés chaque année sur les thèmes « science des aliments » et « nutrition humaine ». Malgré cela, les approches étudiant la réponse immunitaire lors de la progression de l'allergie sont peu présentes. Ce projet aura pour but d'identifier précisément les mécanismes gouvernant l'orientation de la réaction allergique. La recherche dans le domaine de l'allergie alimentaire implique l'utilisation de modèles animaux (souris). Ainsi l'utilisation de modèles souris sera nécessaire pour obtenir un modèle approprié permettant d'étudier *in vivo* de façon intégrée la maladie humaine. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes *in vitro* ou *in silico*. Dans l'allergie alimentaire, de multiples types cellulaires peuvent être impliqués, telles que des cellules T ou des entérocytes, et leurs interactions peuvent avoir un rôle dans la pathophysiologie. De plus, l'allergie alimentaire est caractérisée par des symptômes que seules des modèles animaux peuvent adéquatement reproduire. Ainsi, l'expérimentation animale est un élément essentiel de ce projet afin de modéliser efficacement la réponse physiologique globale du système. Néanmoins, chaque fois que possible, les études sur les animaux seront réduites grâce à l'utilisation de systèmes *in vitro*. Les modèles animaux ne seront utilisés que pour répondre aux questions spécifiques et pertinentes lorsque des éléments de réponse auront été obtenus par des systèmes de remplacement (*in vitro*, *in silico*). Ainsi, ces questions pourront être traitées par un nombre limité d'expériences et d'animaux. le projet va permettre de concevoir et d'évaluer un modèle animal d'allergie alimentaire évolutif vers une allergie respiratoire pour fournir des informations directement pertinentes pour application future à l'homme. De plus, la caractérisation de ce modèle va permettre de réduire un maximum le nombre d'animaux du fait de la connaissance et de la précision des paramètres observés. Enfin, seuls les chercheurs expérimentés et qualifiés effectueront les expérimentations animales. Ces exigences visent à s'assurer que les procédures nécessaires à l'élevage et à l'expérimentation seront exécutées efficacement, avec les soins appropriés afin de minimiser la souffrance des animaux. Le nombre de souris nécessaire sera au maximum de 500 pour la totalité du projet. Les animaux seront logés dans un environnement avec une humidité relative, une température contrôlée et bénéficieront d'un enrichissement.

7769 Ce protocole permet d'évaluer l'impact de l'inhibition d'un ARN ou d'une protéine sur le potentiel métastatique dans sa globalité (de l'intravasation à la colonisation d'organes à distance).

Le modèle 4T1 est un modèle de carcinome mammaire murin spontané pour lequel nous disposons de 4 lignées appelées 67NR, 168FARN, 4TO7 et 4T1 aux potentiels métastatiques croissants. Pour la lignée 4T1, la plus agressive de toutes, nous disposons également d'une lignée bioluminescente stable, appelée 4T1-luc2, qui permet de suivre dans le temps, après greffe dans le fat pad mammaire et sous l'influence d'un traitement, le développement de métastases (essentiellement pulmonaires) par imagerie sur souris sous anesthésie.

Le processus métastatique est un processus complexe multi-étapes et multi-organes qu'on n'appréhende que très partiellement et de manière dissociée dans les modèles d'étude *in vitro*. L'utilisation d'animaux vivants pour étudier la stratégie proposée dans ce projet est donc indispensable.

Afin de respecter la règle des 3R, ces essais de métastases sont réalisés avec une lignée cellulaire exprimant la luciférase pour Réduire le nombre d'animaux utilisés. En effet, l'imagerie permet de suivre le développement de métastases au cours du temps sur les mêmes animaux maintenus en vie tout le temps de l'expérience plutôt que de sacrifier des groupes d'animaux à différents temps au cours de l'expérience. Les animaux sont donc suivis longitudinalement, ce qui diminue le nombre d'animaux à tester (réduction) tout en utilisant une technique non invasive d'imagerie (raffinement) et en augmentant considérablement la puissance statistique des essais. Ainsi, des lots de 20 souris par expérience sont suffisants à raison de 10 souris par condition expérimentale; 10 souris qui reçoivent une molécule dont on veut valider un effet anti-métastatique déjà observé dans des protocoles *in vitro* (tests classiques de migration/invasion sur lignées cellulaires) comparées à 10 souris contrôle qui reçoivent le véhicule. Les travaux de l'équipe sur l'implication des modifications post-transcriptionnelles dans le processus métastatique permettent d'identifier 2 à 3 nouvelles cibles thérapeutiques potentielles par an. Chaque année, 60 souris (20 souris x 3 molécules) seront donc nécessaires à la réalisation de ce projet soit 300 souris en tout sur une période de 5 ans.

Dans un souci de Raffinement, la procédure expérimentale employée dans ce projet est peu invasive et peu douloureuse. L'imagerie bioluminescente étant une technique sensible (plus sensible que l'observation macroscopique des organes disséqués), les animaux sont maintenus en vie un temps court (2 mois environ et sous anesthésie) et sacrifiés avant l'apparition de signes de souffrance respiratoire liés au développement de macrométastases pulmonaires.

7770 Projet :

Vieillir en bonne santé représente un enjeu majeur de notre société actuelle qui connaît depuis un siècle une augmentation continue de l'espérance de vie. Connaître les mécanismes régissant le vieillissement et la longévité permettrait de proposer des mesures thérapeutiques pour mieux préserver la santé de tous et aussi mieux lutter contre les maladies liées à l'âge telles que la maladie d'Alzheimer.

L'axe somatotrope avec ses principales hormones GH et IGF-I coordonne la croissance, le métabolisme, et le vieillissement des mammifères. Une inactivation complète et constitutive du récepteur aux IGF (IGF-1R) dès le début de l'embryogénèse est létale, indiquant que le récepteur a un rôle très important dans le développement *in utero*. Cependant, une réduction de moitié d'IGF-1R, par inactivation constitutive d'un des deux allèles d'IGF-1R, augmente la durée de vie des souris et renforce la résistance au stress oxydant de ses cellules. Ce projet est en parfaite continuité avec le projet en cours "Signalisation IGF-1 et synaptotoxicité induite par le peptide Aβ". Dans ce projet, nous avons créé un nouveau modèle de souris transgénique, permettant d'inactiver IGF-1R spécifiquement dans les neurones, à tout moment de la vie de l'animal. Nous avons montré que ces mutants sont plus résistants à une neuropathologie de type Alzheimer. Nous proposons désormais d'étudier plus spécifiquement le vieillissement physiologique de ces mutants. Notamment, la fonction de reproduction constitue un marqueur biologique majeur du vieillissement.

L'induction du KO est réalisée uniquement chez l'adulte afin de s'affranchir des effets développementaux des IGFs (KO à partir de 2 mois). Ce projet comporte une étude de longévité. Le suivi expérimental de ces modèles de souris comprendra également des analyses de la fertilité des

souris ainsi que des analyses histo-pathologiques et biochimiques des tissus, réalisées sur le même groupe de souris. Chaque souris est utilisée pour un maximum de protocoles expérimentaux, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Ces travaux visent à terme une meilleure compréhension des liens physiologiques entre la croissance, le métabolisme et la longévité chez les mammifères.

Type d'animaux : 236 souris transgéniques et 40 souris commerciales

Nombre d'animaux : ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 276 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

7771 La maladie de Parkinson est une maladie Chronique dégénérative qui touche 0,3% de la population (150 000) en France, 1,2 Million en Europe et 6,3 millions dans le monde). C'est donc un enjeu médical majeur pour lequel seul des traitements symptomatiques existent à ce jour.

Ce projet rentre dans le cadre d'un projet plus global dans le but de développer des molécules à potentiel thérapeutique contre la Maladie de Parkinson et de les amener jusqu' aux essais cliniques (chez l'Homme). Certaines de ces molécules agissent via un mécanisme d'action totalement inédit dans les neurosciences, fruit de plusieurs années de travaux au sein de laboratoires académiques.

L'objectif de ces molécules est de produire au minimum un effet neuroprotecteur en vue de ralentir, voir stopper, l'évolution de la pathologie. Leur mécanisme d'action a été validé *in vitro*. Avant tout passage clinique, elles doivent maintenant être caractérisées *in vivo*. La preuve de concept de l'efficacité dans des modèles animaux de la Pathologie pour des nouvelles molécules, est une étape nécessaire et expressément demandée par tous les acteurs de la chaine de développement des candidats-médicaments.

Que ce soient les médecins, les autorités réglementaires ou les investisseurs qui nous permettront de financer le coût important des essais cliniques, aucun de ces acteurs ne prendra le risque de commencer l'essai clinique sans résultat validé chez l'animal.

Cependant nous avons pleinement conscience de la limite de prédictivité de ces modèles, c'est pourquoi ces molécules sont également présélectionnées sur d'autres critères pour limiter le recours aux essais sur l'animal.

Ces critères consistent notamment à prévalider l'effet des molécules sur cellules humaines et rechercher des biomarqueurs sur échantillons humains indicatifs des chances de succès en clinique. Ces mêmes biomarqueurs seront recherchés chez l'animal. Ainsi, pour diminuer le recours aux essais sur l'animal et augmenter les chances de succès chez l'homme la validation de l'efficacité de ces molécules se fait le plus possible sur des études translationnelles (cellulaires, animales, humaines), malgré la grande difficulté d'obtenir ces mêmes échantillons humains.

Nous avons également choisi des modèles qui permettent de valider l'efficacité de ces molécules dans d'autres pathologie que Parkinson (Notamment la Sclérose Latérale Amyotrophique), ce qui limitera là encore le recours et le nombre d'animaux.

Les modèles animaux de la maladie permettent de valider l'efficacité des molécules dans un organisme entier et d'affiner certaines interrogations comme le choix de la voie d'administration, la posologie, les biomarqueurs qui seront utilisés chez l'homme pour suivre l'efficacité des traitements lors des essais cliniques.

En résumé, ce projet vise à évaluer et caractériser *in vivo* les effets (chez l'homme) de molécules nouvelles dans le cadre de la maladie de Parkinson. La pathologie sera modélisée chez les souris. Un total de 2610 souris sera utilisé sur 5 ans.

La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée:

1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant d'obtenir des données statistiques solides; des études statistiques basées sur les résultats d'autres équipes de recherche nous permettent également d'optimiser le nombre d'animaux.

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; les tests préliminaires nous permettrons de se mettre dans les conditions optimales.

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.

7772 Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'OMS estime à 17,5 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale totale. Développer un nouveau traitement de réparation vasculaire est donc un enjeu de taille de santé publique.

Aujourd'hui, la thérapie cellulaire reste le meilleur espoir pour la reconstruction vasculaire. En effet, de nombreuses études montrent l'efficacité de deux populations de cellules sur la réparation vasculaire : 1-une population de cellules endothéliales s'intégrant directement au sein des nouveaux vaisseaux et 2- une population de cellules favorisant ce phénomène d'intégration aux vaisseaux et permettant une réparation vasculaire plus rapide. Ces deux populations sembleraient donc être de bons candidats pour développer de nouvelles approches innovantes de thérapies cellulaires dans le cadre des pathologies vasculaires.

Cependant, il a été démontré que ces cellules issues de patients atteints de maladies cardio-vasculaires sont plus rares et moins fonctionnelles, rendant la thérapie cellulaire autologue (du même individu) peu efficace. La thérapie hétérologue (d'un individu à un autre) serait donc la meilleure stratégie à envisager mais elle nécessite un traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet de la greffe, traitement présentant de nombreux effets secondaires.

. De nouveaux travaux montrent que ces mêmes cellules provenant du cordon ombilical (périnatales) sont plus nombreuses, plus fonctionnelles et possèdent un pouvoir immunosuppresseur. L'utilisation des cellules périnatales permettrait donc la formation des nouveaux vaisseaux sans l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs.

Nous voudrions ainsi évaluer ces cellules périnatales en terme de tolérance et d'efficacité chez des souris ayant un système immunitaire normal. Cette étude est importante car elle apportera la preuve que ces cellules constitueraient un outil innovant de thérapie cellulaire pour les maladies vasculaires. Cette étude se fera chez la souris adulte mâle immunocompétente et comportera 2 procédures pour un total de 210 souris. La procédure 1 a pour objectif de s'assurer de la viabilité et de la tolérance des cellules périnatales humaines chez la souris. En cas d'échec de la procédure 1 (150 souris) démontrant soit la mort soit le rejet des cellules injectées, le protocole sera arrêté réduisant le nombre de souris utilisées pour cette étude.

Uniquement en cas de succès de la procédure 1, la deuxième procédure (60 souris) sera réalisée. Cette procédure 2 a pour objectif d'évaluer la fonctionnalité des cellules périnatales humaines en visualisant la formation de nouveaux vaisseaux chez la souris.

Des résultats préliminaires *in vitro* nous ont permis de démontrer l'immunotolérance et le pouvoir immunosuppresseur des cellules périnatales. L'utilisation de l'animal est cependant indispensable pour valider ces résultats en conditions expérimentales au plus près de la réalité biologique avant d'envisager la mise en place d'une étude clinique avec ce produit de thérapie cellulaire innovant.

La séquence des procédures limite le nombre d'animaux puisqu'un échec de la 1ère procédure (150 souris) arrêtera le projet. Le modèle choisi pour la procédure 2 permet de faire une cinétique d'un mois sur les mêmes animaux limitant ainsi le nombre d'animaux inclus et améliorant la pertinence des résultats.

La chirurgie est pratiquée sous anesthésie générale et la douleur péri-opératoire est traitée :

Procédure 1 : traitement antidouleur par voie orale (dans l'eau de boisson).

Procédure 2 : traitement antidouleur et anti-inflammatoire par voie sous-cutanée avant l'incision de la peau et à la fin de la chirurgie, avant le réveil.

De l'enrichissement sera ajouté dans la cage et de la nourriture gélinée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress ni de douleur.

L'imagerie des animaux de la procédure 2 se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de caractériser les modifications anatomiques et suivre l'apparition du réseau vasculaire tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition.

Le nombre total d'animaux est de 210 répartis sur les 3 ans du projet.

7773 L'administration de médicaments anesthésiques et analgésiques injectables par voie intra-nasale (IN) représente une stratégie novatrice en médecine vétérinaire. Au cours de la dernière décennie, cette technique a été largement étudiée en anesthésie humaine comme une alternative aux voies classiques d'administration de médicaments. La voie IN offre l'avantage d'être moins traumatisante. En outre, l'administration IN est simple à réaliser, moins douloureuse et stressante. Pour ces raisons cette technique a gagné en popularité en médecine humaine surtout chez les patients pédiatriques. Le but de ce projet est d'évaluer la pharmacocinétique de la Dexmédétomidine après administration IN ainsi que ses effets cardiovasculaires par échocardiographie chez les chiens en bonne santé et de comparer ces résultats à la voie IM. Dans une étude antérieure chez les chiens, nous avons démontré que la fréquence cardiaque est plus stable si la DMDT est administré IN comparativement à l'intramusculaire (IM). Ces résultats nous encouragent à lancer d'autres études visant à évaluer ses effets sur la fonction cardiovasculaire. À notre connaissance, la pharmacocinétique de la DMDT après administration IN n'a pas été étudiée chez les chiens.

L'utilisation d'animaux vivants est ici indispensable nous recherchons à mettre en évidence des phénomènes complexes, qui fait appel à des mécanismes physiologiques multiples qu'il n'est pas possible d'utiliser *in vitro*. Nous avons choisi d'utiliser le Chien parce qu'il s'agit d'un projet visant à améliorer la qualité de la sédation du chien lui-même lors d'actes vétérinaires courants. La DMDT possède déjà une autorisation de mise sur le marché pour cette espèce. Ses effets sont connus. Lors des procédures les animaux ne ressentent pas de gêne importante, ils sont tranquilisés par le produit qui est administré à dose thérapeutique et aucun geste invasif n'est effectué.

Les animaux sont des chiens de laboratoire qui sont régulièrement utilisés pour des procédures de gravité légère. Leur réutilisation est placée sous le contrôle d'un vétérinaire qui s'assure de leur bon état de santé avant et après chaque utilisation. Ces chiens sont ensuite, après 3 à 4 ans, proposés pour un remplacement. Ils sont hébergés en groupes sociaux harmonieux dans des parcs avec des cours donnant à l'extérieur. Le suivi de santé de ces chiens est quotidien. Un total de 6 chiens sera utilisé, ce qui est le nombre minimum pour obtenir des résultats fiables et utilisables par la suite.

7774 -Objectifs du projet :

Ce projet de recherche transversal vise à déterminer quelle est la contribution d'une sous-population de lymphocytes B (LB) nouvellement identifiée dans le processus pathologique de modèles animaux de sclérose en plaques (SEP) connus comme Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE).

Jusqu'à récemment, l'implication des LB dans les pathologies auto-immunes était considérée comme due uniquement à leur capacité à produire des anticorps. Récemment, les résultats de plusieurs travaux de recherche ont fait évoluer ce concept, tendant à montrer l'existence d'un rôle cellulaire majeur des LB dans la réponse inflammatoire indépendamment de la production d'anticorps. Ce projet vise à étudier l'importance du rôle cellulaire des LB dans l'inflammation en s'intéressant plus particulièrement aux modèles animaux de sclérose en plaque.

-Nombre et types d'animaux :

5400 souris seront nécessaires pour mener à bien ce projet.

-Démonstration de la conformité à la règle des 3Rs « Remplacer, Réduire, Raffiner » :

Dans le contexte de la physiopathologie de la SEP, nous étudions plus spécifiquement comment la dérégulation du système immunitaire conduit à une réponse immunitaire ciblant le système nerveux central (SNC). Ces mécanismes complexes impliquent à la fois la destruction tissulaire et la mobilisation du système immunitaire donnant lieu à une neuropathologie chronique. Ces événements sont uniquement reproduits dans des modèles animaux. Il n'existe aucune alternative *in vitro*, ni *in silico* actuellement.

Le nombre d'animaux utilisés correspond, dans notre expérience et dans celle des groupes travaillant sur les mêmes modèles, au nombre minimal permettant une interprétation sans ambiguïté des résultats. En effet, la variabilité inter individuelle ne nous permet pas de diminuer le nombre d'animaux par groupe en dessous de 4 si nous voulons conserver une distribution de valeurs statistiquement interprétables. La reproductibilité scientifique nous oblige à assurer trois expériences indépendantes.

De nombreuses mesures de raffinement seront prises pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux. Ainsi les animaux seront manipulés quotidiennement avec douceur et calme. Un suivi de la prévalence et de la sévérité de la maladie sera effectué quotidiennement. Le poids corporel sera enregistré. Les signes de souffrance ou de déshydratation seront recherchés de manière active et des soins adaptés seront prodigués. Dès l'apparition des symptômes, la nourriture sera fournie ad libitum directement au fond de la cage et de l'eau gélifiée sera mise à disposition afin de préserver une hydratation correcte.

Enfin, des points limites adaptés au modèle ont également été définis par rapport à la souffrance potentielle des souris durant l'expérimentation.

7775 Malgré un traitement par irradiation complète du cerveau, le traitement des métastases cérébrales reste malheureusement à caractère palliatif puisqu'il consiste en une prise en charge non spécifique et tardive de la maladie. La problématique réside donc dans la nécessité d'apporter un traitement non seulement plus spécifique des métastases cérébrales en tenant compte notamment de l'hétérogénéité inter-patient mais aussi plus précoce. Il serait donc intéressant d'évaluer le potentiel thérapeutique d'une adaptation des protocoles de radiothérapie en fonction des paramètres biologiques de la tumeur. L'imagerie multimodale et notamment fonctionnelle apparaît ici comme étant un outil très intéressant pour la caractérisation de ces paramètres biologiques pouvant servir de cibles thérapeutiques. Nous proposons donc, dans ce projet, de caractériser par imagerie multimodale IRM et TEP, au niveau préclinique, deux modèles de métastases cérébrales de cancers les plus prévalent chez le patient, à savoir les cancers du poumon et du sein en s'intéressant au compartiment tumoral mais aussi à son microenvironnement (hypoxie et inflammation) et à sa vascularisation. Concernant l'aspect « remplacement », ce projet ne peut pas s'effectuer sur des modèles de remplacement *in vitro* ou *in silico* car les tumeurs sont connues pour être multicompartimentales, c'est-à-dire qu'au-delà du simple compartiment de la cellule tumorale existe les compartiments mentionnés précédemment. Or ces composantes étant très importantes dans les phénomènes de résistance aux traitements et de développement tumoral, il est nécessaire d'utiliser des modèles *in vivo* complets regroupant tous les compartiments des tumeurs cérébrales ainsi que le fonctionnement global de

l'organisme. Le choix d'animaux immunodéprimés pour notre projet (rats et souris Nude) se justifie par l'utilisation de cellules humaines de métastases cérébrales.

La caractérisation de la physiopathologie tumorale des modèles de métastases cérébrales utilisera l'imagerie médicale IRM et TEP, c'est pourquoi elle sera réalisée sur des rats au regard de la faible résolution spatiale de la TEP peu compatible avec l'imagerie du cerveau de souris. Afin de réaliser ce projet, des expérimentations préliminaires seront nécessaires permettant le développement de cellules de métastases cérébrales traçables par IRM. Pour cette partie nous souhaitons utiliser la souris car ce modèle de métastases cérébrales est à l'heure actuelle mieux caractérisé chez la souris. L'utilisation des méthodes d'imagerie non invasive se conforme à la réglementation en vigueur dans le respect de la réduction du nombre d'animaux car permettant de suivre à différents temps l'évolution de la tumeur. Le nombre total de rats nécessaires sera ainsi de 60 rats Nude et de 8 souris Nude. Enfin, dans un souci de respecter la règle des 3R, concernant l'aspect « raffinement », les différents protocoles ont été pensés de manière à limiter au maximum la souffrance animale et ainsi augmenter le bien-être animal avec par exemple des applications de xylocaïne après l'acte chirurgical ou l'utilisation d'anesthésie pour les acquisitions d'imagerie médicale afin d'éviter un maximum le stress de l'animal.

7776 Effets de la délétion de la protéine OB-RGRP sur le métabolisme et la balance énergétique ». Ce projet a pour objectif de caractériser la (ou les) fonctions d'une protéine apparentée au Récepteur de la leptine (OB-RGRP) dans la régulation énergétique. La Leptine est principalement sécrétée par le tissu adipeux blanc. Sa liaison au récepteur OB-R conduit au déclenchement de multiples voies de signalisation. Elle agit au niveau du noyau arqué de l'hypothalamus pour réguler les dépenses énergétiques et la prise alimentaire. L'obésité est souvent liée à un déficit de sensibilité à la leptine. Le plus souvent, les malades obèses et ou atteints de diabète de type 2, présentent une "résistance à la leptine", avec des taux de leptine circulante paradoxalement élevés alors qu'ils sont incapables d'induire une réponse adéquate. Une nouvelle famille de protéines, les endospanines 1 et 2 a été caractérisée. Ces protéines modulent spécifiquement la sensibilité des cellules à la leptine en régulant le trafic intracellulaire de OB-R. L'inactivation de l'endospanine 1 (OB-RGRP) chez la souris induit l'augmentation du nombre d'OB-R membranaires des cellules cibles. Lorsque cette inactivation est ciblée au niveau des neurones du noyau arqué de l'hypothalamus, les souris soumises à un régime riche en graisse ont un métabolisme glucidique perturbé. L'objectif de ce projet est d'étudier les effets de l'inactivation totale ou ciblée du gène de l'endospanine 1 (OB-RGRP) et l'étude des conséquences de cette inactivation sur la réponse à la leptine. Le but à long terme, serait de trouver de nouvelles voies thérapeutiques pour prévenir le développement de la résistance à la leptine, de l'obésité et du diabète de type 2.

Exigences :

Remplacement : Nous avons besoin d'étudier les effets physiologiques du gène Endospanine1, les souris délétées pour ce gène sont un modèle idéal.

Réduction : Nous allons utiliser un nombre minimal de souris (C57Bl/6 Endospanin 1 souris KO, n=9; et souris C57Bl/6 Wild type, n=9) pour remplir les exigences statistiques.

Raffinement : Nous planifierons correctement le protocole d'élevage et d'hébergement (soins et enrichissement du milieu) des animaux dans le but d'augmenter autant que possible leur bien-être ; nous utiliserons des procédures d'euthanasie appropriées, et déterminerons les points limites qui permettront d'éviter toute détresse ou souffrance aux animaux sous protocole.

7777 Le cancer du pancréas est la 4ème cause de décès par cancer dans le monde. Seul 15% des patients sont opérables et ceux-ci ont une chance de survie de 20% à 5 ans. Pour les autres tumeurs (ex : localement avancées ou métastatiques), la chimiothérapie systémique a une efficacité médiocre en raison d'un haut degré de chimiorésistance. Considérée comme l'évènement génétique initiateur du cancer du pancréas, la mutation K-ras est présente dans plus de 90% des adénocarcinomes pancréatiques. Il a été observé au niveau de tumeurs humaines pancréatiques et dans un modèle animal, que certaines mutations induisent un mécanisme de détoxification des formes réactives de

l'oxygène via un facteur de transcription appelé Nrf2 et que cette activation de Nrf2 favorise la croissance tumorale.

Le rôle de Nrf2 dans l'oncogenèse a été en partie étudié *in vitro* dans le cancer du pancréas. Mais aucune étude animale n'a précisé l'implication de la voie Nrf2 sur le microenvironnement tumoral, notamment la réaction immune tumorale, qui joue pourtant un rôle clé dans le développement, la migration tumorale et la chimiorésistance.

Ce travail a pour but d'étudier l'implication de la voie Nrf2 dans l'oncogenèse pancréatique, sur la croissance tumorale, au niveau du microenvironnement tumoral et sur les mécanismes de chimiorésistance dans 3 modèles murins différents : un modèle de tumeur implantées en sous-cutanée, un modèle de tumeur solide implantée dans le pancréas et un modèle de souris transgénique appelé KPC. Des expériences préliminaires seront réalisées *in vitro* sur les cellules tumorales issues de tumeurs KPC et de lignées cellulaires de tumeurs pancréatiques, afin de définir et d'optimiser les paramètres d'injection et de réduire le nombre d'animaux. Des activateurs et inhibiteurs de Nrf2 seront préalablement testés *in vitro*, afin de sélectionner les molécules ayant le plus d'intérêt et de minimiser le nombre de souris utilisées par la suite. Cette étude conduira à optimiser les modalités thérapeutiques, prédire les effets d'une association médicamenteuse avec une chimiothérapie conventionnelle (Gemcitabine) sur la croissance tumorale, *in vivo*. Le modèle de tumeur sous-cutanée nécessitera 144 souris, pour l'implantation dans le pancréas 132 souris seront utilisées et pour les souris transgéniques KPC 48 souris seront nécessaires, soit 324 animaux et 10 souris supplémentaires seront nécessaires pour des études de faisabilité (334 souris au total). Un suivi quotidien des souris permettra d'évaluer l'évolution du cancer et de maintenir leur bien-être en respectant les points limites de taille de tumeur et d'état générale des animaux.

7778 Etudes de Toxicité et de Toxicocinétique chez le Singe Cynomolgus (*Macaca fascicularis*) ou Rhesus (*Macaca mulatta*).

Dans le cadre du diagnostic, de la prévention et du traitement des maladies humaines et animales, la recherche de nouveaux médicaments apportant une meilleure sécurité d'emploi, une efficacité accrue ou tout autre avantage thérapeutique reste essentielle. Compte tenu de la complexité des organismes visés par cette recherche, il n'existe pas à ce jour de méthode alternative fiable au recours à l'animal. Dans un souci de protection de la santé publique, la loi exige que l'innocuité des candidats médicaments soit évaluée lors d'études précliniques chez une espèce rongeuse et une espèce non rongeur. Ces études doivent en outre être conduites en respectant les Bonnes Pratiques de Laboratoires (BPL) qui garantissent leur qualité et intégrité. Elles sont à ce titre l'objet d'inspections réglementaires spécifiques et sont destinées à être soumises à différentes autorités réglementaires à diverses étapes du développement de médicament.

Ce projet sur 5 années couvre les études réglementaires de toxicologie et de toxicocinétique telles que définies ci-dessus et réalisées chez le singe. L'objectif de ce projet est de définir les procédures opératoires mises en œuvre chez le singe cynomolgus ou rhesus dans le cadre des études précliniques de toxicologie générale/ toxicocinétique pour les candidats médicaments (humains et vétérinaires), en vue de soumissions réglementaires internationales incluant les INDA (Investigational New Drug Applications), les CSA (Clinical Study Applications), les NDA (New Drug Applications), les WMA (World Wide Marketing Applications) et IB (Investigational Brochures). Ces études sont exigées par les réglementations nationales (par exemple en France l'Arrêté du 9 septembre 1996 NOR : TASP9624370A) et précisées dans les lignes directrices internationales (OCDE, ICH,...). Des études d'efficacité, de pharmacologie, d'interaction entre médicaments ou à des visées plus mécanistiques (biomarqueurs) permettant de comprendre et prédire les effets toxiques sont aussi couvertes par cette demande. Certaines de ces études peuvent en outre viser de raffiner et de réduire le recours à l'animal, voire de le remplacer dans l'avenir. Le nombre total d'animaux couverts par ce projet est 1000 sur une période de 5 ans (une centaine d'études). Les animaux utilisés dans les études sont originaires d'élevages agréés. La composition, le contenu et le déroulement des études réglementaires couvertes par ce projet sont précisées dans des lignes directrices internationales (OCDE, ICH, VICH...) afin d'obtenir les résultats les plus fiables et scientifiquement pertinents tout en garantissant les plus hauts standards en matière de qualité, bien-être animal, et d'éthique (remplacement, réduction, et raffinement). A ce titre, celles-ci requièrent :

- des singes des 2 sexes, dont l'âge et poids peuvent varier.
- le nombre minimal d'animaux est dicté par les lignes directrices réglementaires internationales (OCDE notamment).
- une durée (de un jour à environ 12 mois),
- et des procédures (administration du candidat médicament, observations et examens réguliers, suivi médical individuel, et examens terminaux).

Les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant les dommages pour les animaux ; de fait, la plupart des animaux des premières études, réalisées sur la base d'informations très limitées, auront des effets légers à modérés, et un très faible nombre d'entre eux pourra avoir des effets substantiels. Dans les études suivantes, ceux-ci ne devraient avoir pas d'effets ou seulement avoir des effets légers à modérés. Des effets sporadiques, généralement légers et transitoires, peuvent aussi être observés du fait des propriétés pharmacologiques du candidat médicament. Une attention particulière est apportée aux exigences de remplacement, réduction et raffinement tout au long des études, depuis leur conception jusqu'aux données présentées aux agences afin de conduire les essais cliniques chez l'homme. En particulier, les singes sont hébergés en volières ou par groupes stables d'animaux compatibles avec de l'enrichissement social tels que : interactions avec les congénères, interactions avec l'homme, stimulation image/miroir, perchoir, objets à manipuler, récompenses alimentaires. L'animal peut être soumis soit à une habituation aux procédures, soit à une sédation pour limiter l'inconfort et l'angoisse. Après chaque étude, une appréciation rétrospective est faite par le Comité d'Ethique.

7779 L'augmentation croissante du diabète dans le monde en fait désormais un problème de santé publique nécessitant l'amélioration de la qualité des soins, la prise en charge thérapeutique et la maîtrise des couts de traitement.

Le traitement du diabète dans le monde repose en grande partie sur l'utilisation de différents types de molécules, tels que l'insuline, le glucagon ou autres molécules actives agissant sur la glycémie. Actuellement, de nouveaux excipients pharmaceutiques sont en cours de développement, permettant entre autre d'améliorer la biodisponibilité, la solubilité et la stabilité de protéines thérapeutiques recombinantes humaines. Grâce à ces excipients, il est désormais possible de combiner différents types de molécules actives afin d'améliorer la prise en charge des patients et d'être au plus proche d'un rythme physiologique de sécrétion d'insuline, permettant ainsi de diminuer le nombre d'injection pour le patient et de limiter les événements hyper ou hypoglycémiques. Cette avancée technologique permet également d'améliorer l'efficacité des différents types de molécule. Après évaluation *in vitro* des différentes formulations et afin d'évaluer leur efficacité, les modèles animaux cochons et chiens doivent être utilisés. Ceux-ci sont largement décrits dans la littérature et les protocoles d'évaluation respectent les normes de bien-être animal avec l'établissement de points limites, un suivi sanitaire strict et une constante attention de chaque individu. L'utilisation des deux modèles permet d'affiner les choix thérapeutiques au plus proche des besoins humains afin d'établir une preuve de concept préclinique pour le lancement d'essai clinique. Le nombre d'individus choisis en étude (soit 100 chiens, 100 porcs, 1500 Rongeurs sur 5 ans) représente le minimum nécessaire afin d'établir des comparaisons et envisager des études réglementaires. Les risques potentiels encourus pour les animaux sont principalement des risques hypoglycémiques ou légèrement hyperglycémiques, pour lesquels des critères d'évaluation et de surveillance sont strictement appliqués, grâce au suivi des indices glycémiques. Des mesures de prise en charge adaptée aux hypoglycémies sont prévues (perfusion de glucose, réchauffement). En parallèle des essais d'efficacité, des études de toxicité sur l'animal sont recommandées par les lignes directrices ICH, et en particulier sur les rongeurs. Pour ce faire, l'évaluation de la toxicité potentielle de différents excipients est prévue, en réalisant des études de screening de toxicité. Ces études de toxicité sont conduites principalement sur le rat, espèce pour laquelle les constantes biologiques et de bien-être animal sont largement connues et décrites (environ 1500 rats sur 5 ans).

Enfin, l'évaluation de la tolérance locale joue au premier ordre dans l'utilisation de produits pharmaceutiques à base de molécule active et devant être utilisés plusieurs années chez l'homme.

Pour ce faire des études de tolérance locale sont réalisées sur le porc, en fin d'étude d'efficacité et afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires au développement.

A l'issue de ces études, les excipients retenus poursuivent leur développement en études de toxicologie réglementaires avant d'être utilisés en essais cliniques chez l'homme. Ces essais respectent les lignes directrices internationales et sont conformes aux règles éthiques en vigueur, l'utilisation animale étant restreinte à son minimum nécessaire.

7780 Contexte :

Le projet a pour but d'évaluer l'efficacité d'un nouveau vaccin destiné au chat.

Pour qu'un médicament soit autorisé, il faut démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique pour l'animal pour la pathologie considérée. Les études sont réalisées sur l'espèce cible.

Pour démontrer l'efficacité d'un produit contre un agent pathogène, la mise au point préalable d'un modèle d'épreuve est indispensable. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène pour reproduire, de manière expérimentale, la pathologie le plus fidèlement possible à la réalité.

Identifié pour la première en 2009 à Hong Kong, le Morbillivirus félin est associé à une insuffisance rénale chronique (IRC), et ce nouveau virus est maintenant largement répandu dans le monde.

Objectifs :

L'objectif du projet est donc a) la mise au point d'un modèle d'épreuve et b) de déterminer l'effet protecteur de la vaccination contre le Morbillivirus félin.

Avantages et dommages :

Le développement expérimental de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur à l'animal. L'administration de l'agent pathogène peut également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques et précoces sont appliqués.

La finalité de ces études est de développer des vaccins efficaces pour réduire l'impact de l'infection par le Morbillivirus félin chez le chat.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur les exigences réglementaires et les projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé à 300 chats.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Lorsque cela est possible, une première étape dans le projet de développement d'un vaccin consiste à tester *in vitro* différents candidats. Ceci permet une première sélection, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester *in vivo* donc en évitant le recours à l'animal. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie notamment concernant le développement des tests analytiques et modalités de suivi clinique.

Réduction : Pour les études réglementaires, le nombre d'animaux est fixé par les textes (pharmacopée). En amont, lors des phases de recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chats utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement :

Des points limites spécifiques ont été définis afin de limiter le plus précocement possible la douleur des animaux. Ces critères sont en constante évolution pour les améliorer de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes, si nécessaire.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge pour maximiser leur confort et leur bien-être. Dans la majorité des cas, les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place.

La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

7781 La Borréliose, aussi appelée maladie de Lyme, est une maladie infectieuse due à la transmission d'une bactérie, la *Borrelia*, lors d'une morsure de tique infectée. Le diagnostic de la maladie de Lyme est complexe. Il repose, à la fois, sur les signes cliniques, l'épidémiologie et sur des tests biologiques en laboratoire. Il est primordial de diagnostiquer au plus vite la maladie pour limiter le risque de développer une maladie de Lyme dite chronique ou persistante. Les signes cliniques sont très variés, peu spécifiques (lésions cutanées, douleurs articulaires, manifestations cardiaques et neurologiques) et peuvent apparaître plusieurs années après avoir été infecté par la bactérie *Borrelia*, ce qui rend d'autant plus difficile le diagnostic. Les tests diagnostiques de laboratoire reposent exclusivement sur des mesures indirectes basées sur la recherche d'anticorps dirigés contre la bactérie (diagnostic sérologique). Ces tests souffrent d'un manque de sensibilité, de spécificité et d'une absence de standardisation. Sur la vingtaine de souches *Borrelia* connues et répandues en Europe, les tests en détectent uniquement trois, ce qui peut expliquer, en partie, leur manque de sensibilité en France. Il est ainsi fréquent de ne pas retrouver d'anticorps dirigés contre *Borrelia* chez des personnes pourtant infectées par la bactérie. Le diagnostic direct, par détection de la bactérie, est possible mais difficile car leur nombre dans le sang ou sur le point d'infection est très faible et/ou difficilement accessible. Comme souvent en bactériologie, la culture est la technique de référence (100% spécifique). Mais dans le cas de *Borrelia*, cette approche est particulièrement longue (culture qui dure 2 à 8 semaines) et peu sensible. Il y a donc une véritable demande pour des tests diagnostiques plus fiables et précoces, demande en adéquation avec le plan national de lutte contre la maladie de Lyme, lancé en septembre 2016 par la ministre de la santé.

Notre objectif est de développer un test diagnostique direct basé sur la détection de marqueurs produits par la bactérie au cours de l'infection. Dans un premier temps, il s'agit de mettre en évidence la présence d'antigènes bactériens, dans des fluides biologiques (sang et urine) chez un modèle murin infecté par *Borrelia*. Après leur identification, des anticorps monoclonaux seront produits pour développer des tests de détection. Une pré-validation du ou des tests de diagnostic de la maladie de Lyme sera d'abord réalisée sur des échantillons biologiques de rongeurs infectés par différentes souches de *Borrelia*.

Les infections seront réalisées sur un modèle rongeur, né et élevé dans des établissements agréés à des fins scientifiques. Leur nombre de 384 a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats interprétables d'un point de vue statistique et de disposer suffisamment de fluides biologiques pour développer et pré-valider un futur test de diagnostic de la maladie de Lyme. L'état de santé et le bien-être des animaux, hébergés en groupes, seront surveillés tout au long de l'expérience. Les animaux préalablement anesthésiés seront infectés par injection sous-cutanée de *Borrelia* puis des prélèvements sanguins et urinaires seront effectués. La souffrance causée par l'infection sera évaluée grâce à une grille codifiant le niveau de douleur. Dès le moindre signe de souffrance, des protocoles d'analgésie réfléchis au préalable, seront mis en œuvre pour soulager les animaux. Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Dans le cadre du bien-être animal, des modules seront ajoutés dans les cages d'hébergement afin de varier les activités des animaux.

7782 Les tumeurs pédiatriques sont à la fois rares, puisqu'en France, un enfant sur 440 va développer un cancer avant l'âge de 15 ans, mais elles représentent 28% de la mortalité infantile ce qui en fait la 2ème cause de décès chez les 1-14 ans après les accidents. Les principaux cancers pédiatriques sont les leucémies (29%), les tumeurs du système nerveux central (23%), les lymphomes (12%) et les neuroblastomes (8%). Au niveau des traitements, les tumeurs d'origine sanguine (leucémie, lymphome) ont lors de ces 30 dernières années vu une amélioration de leur pronostic progresser de manière fulgurante, notamment par l'utilisation de chimiothérapies. En ce qui concerne les tumeurs dites « solides », bien que les traitements aient également progressé lors de cette période, les progrès ne sont malheureusement pas au niveau de ceux qui ont été atteints pour les tumeurs d'origine sanguine. Afin d'identifier les meilleures pistes thérapeutiques pour ces patients, des essais dits précliniques sont effectués et reposent notamment sur l'efficacité anti-tumorale de ces nouvelles molécules dans des modèles précliniques de xénogreffes. Dans ces derniers, des lignées cellulaires

dérivées de tumeurs sont injectées dans des souris immunodéprimées afin d'y faire se développer une tumeur et d'évaluer l'activité de ces molécules. Cependant, l'efficacité anti-tumorale de ces molécules sur de telles xénogreffes et sur les tumeurs des patients est souvent faiblement corrélée. L'amélioration de la valeur prédictive de ces modèles précliniques peut être obtenue grâce à des modèles de xénogreffe dérivée de la tumeur du patient (appelé PDX pour patient-derived xenograft), dans lesquels un fragment tumoral provenant du patient est greffé dans les plus brefs délais chez des souris immunodéprimées. De plus, lorsque la tumeur est implantée de manière orthotopique, c'est-à-dire dans le même organe chez la souris que la tumeur chez le patient, ces PDX permettent parfois de mimer la dissémination métastatique et de mieux comprendre ce processus qui reste l'une des causes de mortalité majeure chez ces patients. Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet et devraient permettre de faire un lien entre les résultats précliniques et d'éventuelle application clinique. A l'heure actuelle, ces modèles PDX n'ont pas d'équivalence qui leur permettraient d'être remplacés par de approches alternative de type *in vitro*. Le nombre d'animaux utilisés (6540 souris pour 5 ans) pour mener à bien ce projet a été réduit au minimum pour l'établissement de chaque modèle et de son évaluation. Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis. Les animaux seront suivis en accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux. Il s'agit d'un protocole permettant de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening *in vitro*. Il est en effet absolument nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque. De plus, un effort collectif au niveau français et européen est actuellement en cours afin de générer un panel représentatif de PDX pour la plupart des cancers pédiatriques à haut risque dans lesquels ces modèles sont échangés afin de minimiser le nombre d'animaux nécessaires aux différents essais précliniques en partageant ces modèles.

7783 La colonisation du poumon par *Pseudomonas aeruginosa*, une bactérie pathogène, est une caractéristique clinique de la mucoviscidose qui provoque une altération importante des fonctions pulmonaires. L'éradication de la bactérie par un traitement antibiotique est reconnue pour retarder les altérations et améliorer le pronostic des patients. Cependant, le traitement n'est pas ou peu efficace. Lorsque l'infection devient chronique, la bactérie devient résistante aux antibiotiques.

Le but de notre projet est de développer une nouvelle stratégie pour prévenir les infections respiratoires à *P. aeruginosa* fréquemment retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose et sous ventilation mécanique. L'immunité innée est naturellement présente chez les patients et peut être stimulée grâce à des molécules très spécifiques et non toxiques. Elles vont induire des réponses antibactériennes naturelles. Pour atteindre notre objectif, nous testerons sur le modèle porc : 1) la capacité immunostimulatrice de plusieurs concentrations de flagelline (un stimulant de l'immunité innée) par voie aérienne et 2) la capacité de cette dernière à augmenter la réponse immunitaire contre les infections à *Pseudomonas aeruginosa*. Si c'est le cas, les animaux seront prétraités ou non avec la flagelline (prophylaxie) et infectés ou non avec *Pseudomonas aeruginosa*. L'administration de la thérapie sera réalisée par voie pulmonaire communément utilisée dans les traitements des infections respiratoires à *P. aeruginosa*. L'analyse dans le modèle porcin sera un élément essentiel dans une perspective translationnelle. En effet, le porc a un système respiratoire analogue à l'Homme sur le plan anatomique, fonctionnel et immunologique.

Cette approche permettra d'améliorer la réponse immunitaire contre des infections bactériennes qui deviennent résistantes aux antibiotiques. Il est prévu d'utiliser 42 porcelets âgés de 28 jours et sevrés pour répondre aux questions scientifiques.

Remplacement : La réponse immunitaire contre *Pseudomonas aeruginosa* est très complexe et implique plusieurs acteurs (épithélium, mucus, transport mucociliaire, cellules immunitaires), ce qui rend difficile la modélisation *in vitro*. Aussi, le but de ce projet est de déterminer la capacité prophylactique de la flagelline chez le porc sain, pour la tester ensuite (si elle est efficace) sur des modèles de porcs atteints de mucoviscidose.

Aucune méthode alternative ne peut remplacer ce modèle porc *in vivo* mimant une maladie humaine comme la mucoviscidose.

Réduction : Ce projet est une preuve de concept et nous utiliserons le moins d'animaux possible ; une stratégie d'expérimentation est établie dans ce sens. Ce projet permettra de déterminer l'efficacité de la flagelline pour lutter contre les infections à *P. aeruginosa*. Tous les porcelets seront utilisés soit pour étudier la capacité immunostimulatrice de la flagelline, soit l'efficacité de la thérapie contre les infections à *P. aeruginosa*.

Raffinement : les porcelets seront maintenus sous anesthésie durant l'inoculation de la thérapie et durant l'infection pour contrôler la douleur; sous supervision vétérinaire et dans des conditions d'enrichissement social (groupe/visites animalières) et environnementales (ballon, chaînes).

7784 Dans le contexte de la réduction de l'utilisation d'antibiotiques en médecine vétérinaire et afin de limiter l'émergence de la résistance bactérienne, le développement de stratégies thérapeutiques alternatives est fortement encouragé. SDN-1001 est une petite molécule chimique, n'étant dotée d'aucune activité antibiotique mais présentant des effets immunomodulateurs intéressants *in vitro*.

L'objectif de l'étude est d'évaluer l'effet protecteur (sur la mortalité) du composé SDN-1001 chez la souris dans un modèle d'infection bactérienne aiguë (septicémie) à *E. coli* ou *S. aureus*, deux agents pathogènes majeurs, fréquemment retrouvés dans les infections vétérinaires.

Deux phases sont prévues pour cette étude :

1- Phase pilote afin de mettre au point les deux modèles d'infection et de déterminer la dose létale 100 (LD100) des deux souches bactériennes ;

2- Phase d'efficacité (mesure de l'amélioration de la survie) permettant d'évaluer l'activité du nouveau composé SDN-1001 (à différentes doses) par rapport à un peptide de référence et à la ciprofloxacine (antibiotique de référence) dans chacun de ces modèles d'infection.

237 souris BALB/c sont nécessaires pour la mise en œuvre de ce projet.

Dans le cadre de cette étude, une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R. Tout d'abord une étude pilote sera préalablement prévue afin de réduire au maximum le nombre d'animaux par point dans la phase d'efficacité (7 au lieu de 10). Des analyses *in vitro* ont déjà été réalisées sur l'efficacité de cette molécule SDN-1001. Toutefois l'efficacité de tels composés ne peut être que confirmé dans des modèles précliniques, c'est pourquoi aucune stratégie de remplacement ne peut être envisagée. Enfin, un enrichissement du milieu (jouets en plastique, igloos en carton) sera utilisé et une surveillance quotidienne sera également réalisée pour cette étude.

7785 Ce projet est un projet de recherche fondamentale dans le domaine de la santé publique. Les maladies cardiovasculaires sont encore un problème de santé publique et les perspectives ne sont pas encourageantes du fait de l'augmentation de la prévalence des maladies métaboliques, notamment du diabète. Un nombre important de décès par mort subite chaque année montre notre incapacité à prévoir ces accidents et notre méconnaissance des facteurs de risque.

La cause immédiate de ces décès est l'athéromatose, c'est-à-dire la formation d'un thrombus au contact de la plaque d'athérosclérose et provoqué vraisemblablement par la rupture de cette plaque.

Le projet vise à la mise au point de nouveaux agents de contraste pour la détection non invasive de la plaque d'athérome par une technique d'imagerie appelée : tomographie par émission de positrons (TEP). Les nouveaux agents de contraste proposés sont des nanoparticules lipidiques marquées au gallium-68 (⁶⁸Ga) ou au cuivre-64 (⁶⁴Cu), des isotopes radioactifs adaptés à l'imagerie TEP. La biodistribution et le ciblage des nanoparticules lipidiques radiomarquées au ⁶⁸Ga ou ⁶⁴Cu ne peuvent être connus qu'avec les résultats de l'expérimentation. Ces données sont essentielles pour envisager un développement clinique de ces agents de contraste. Dans ce projet nous utiliserons 120 souris Des souris APOE -/- soumises à un régime riche en graisse durant 20 semaines. Durée du projet 24 mois.

Le remplacement n'est pas envisageable dans ce projet puisque nous cherchons à obtenir des données *in vivo* sur la détection de la plaque d'athérome. Les techniques d'imagerie *in vivo* utilisées dans le protocole ne nécessitent pas l'euthanasie de l'animal et sont considérées comme non-invasives. Chaque animal pourra être investigué à chaque temps de mesure cela permet donc la réduction du nombre d'animaux nécessaires. Une étude statistique a été réalisée afin de calculer le

nombre d'animaux nécessaires. Des points limites ont été établis afin d'intégrer au maximum la préconisation des 3 R qui est de Remplacer et Raffiner les modèles d'études actuels afin de Réduire le nombre d'animaux inclus dans le projet expérimental. Les porcelets seront maintenus sous-anesthésie durant l'inoculation de la thérapie et l'infection pour contrôler la douleur et sous supervision vétérinaire. Ils seront hébergés en groupe pour améliorer les conditions d'enrichissement social. Les animaux auront des jouets type chaîne et ballon. De plus, une surveillance bi-journalière sera effectuée. Les animaux seront hébergés en lots de 2 porcs minimum, sur caillebotis (1.8 m²/porc) en (niveau de confinement 2 avec des paramètres d'ambiance contrôlés (température et hygrométrie).

7786 Ce diplôme universitaire a pour but l'enseignement de la microchirurgie (Chirurgie qui permet de pratiquer avec un microscope opératoire et grâce à des instruments spéciaux des interventions très précises sur des organes de petites dimensions) dans le cadre de spécialités chirurgicales, pour des chirurgiens en formation. Ce DU concerne surtout les spécialités suivantes : chirurgie plastique, chirurgie orthopédique, chirurgie maxillo-faciale, ophtalmologie et ORL mais aussi les vétérinaires.

Les applications de la microchirurgie sont nombreuses : réimplantation de membre, réparation de lésions nerveuses et ou vasculaires mais surtout les cas de reconstruction. Afin de permettre la couverture de pertes de substance tissulaires et la reconstruction, des lambeaux tissulaires sont transplantés d'un site donneur à un site receveur restaurant ainsi non seulement la couverture mais assurant aussi la reconstruction d'organes fonctionnels. Il s'agit d'une véritable auto transplantation tissulaire.

Cette activité nécessite une formation spécifique en dehors de la formation au bloc opératoire.

Le nombre de rats utilisés sera déterminé en fonction du nombre d'inscrits au Diplôme Universitaire. On compte une moyenne de 10 rats par an et par étudiant.

"Jamais la première fois sur le patient", c'est la préconisation de la Haute Autorité de Santé. Il est bien évident que pour des raisons de sécurité, ce type d'apprentissage ne peut pas s'effectuer sur le patient la première fois.

Certes, la formation chirurgicale utilise d'autres méthodes d'apprentissage comme les TP de dissection sur cadavres et la formation par simulation, ou l'apparition de solutions technologiques de plus en plus performantes permettent de simuler de nombreuses situations de soins, mais actuellement, aucun simulateur ne permet de reproduire ce type de geste chirurgical. Ce type de chirurgie nécessite de travailler *in vivo* pour maîtriser les problèmes liés au sang (thrombose, hémorragie, hémostase...) et pour vérifier si les sutures sont bien perméables.

Concernant les conditions d'enrichissement, les rats disposeront dans leurs cages individuelles de TOP BRICK qui sont des modules de cœur de bois de peuplier qui permettent de développer l'activité d'exploration de l'animal et de participer à son bien-être.

Pour ce projet, on constate qu'il faut une moyenne de 10 rats par étudiant afin de maîtriser les différentes techniques microchirurgicales. Par conséquent, avec une moyenne de 15 étudiants par an environ 750 rats seront utilisés sur 5 ans.

7787 L'excès de fer est un facteur favorisant le stress oxydant et l'inflammation, deux processus pathogéniques communs aux dégénérescences rétinienne. D'ailleurs, une accumulation de fer est observée dans la rétine de patients âgés, atteints de DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge), ou de décollement de la rétine. La DMLA est la principale cause de cécité chez les personnes de plus de 55 ans dans les pays industrialisés. En France, 12% des personnes âgées entre 65 et 75 ans sont concernées. Le décollement de la rétine (DR) touche tous les âges et survient suite à un traumatisme, une forte myopie, ou secondaire à une pathologie chronique (DMLA, rétinopathie diabétique). Ainsi le fer joue un rôle déterminant dans la pathogénèse des maladies rétinienne.

Notre projet consiste 1/ à étudier le rôle du fer et des protéines de sa régulation dans le processus de dégénérescences rétinienne.

Pour cela, nous étudierons l'effet d'une injection de fer dans le vitré ; 2/ trouver de nouvelles voies thérapeutiques et ainsi diminuer et/ou ralentir les maladies dégénératives rétinienne. Pour cela, nous testerons des protéines naturelles chélatrices du fer dans leur capacité à contrôler l'excès de fer dans

les maladies rétinienne et testerons deux techniques de délivrance. Au total, 240 souris et 145 rats seront utilisés. Nous limiterons au maximum le nombre d'animaux utilisés par des stratégies de remplacement et de réduction. En effet, les doses de fer entraînant une mort des cellules neuronales rétinienne ainsi que le choix et les concentrations de protéines chélatrices neuroprotectrices étudiées seront déterminés *in vitro* avant l'utilisation sur les animaux. L'exploration fonctionnelle *in vivo* permettra de suivre le même animal sur toute la durée du protocole expérimental réduisant le nombre d'animaux. Toutes les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et locale et une veille de la douleur sera effectuée au réveil et cette dernière traitée par des antalgiques adaptés.

7788 La recherche sur le sujet cancer/cycle circadien tourne surtout autour du dérèglement circadien par des mutations de gènes et ou par un empêchement ou arrêt de la sécrétion de mélatonine. Par contre, même s'il est bien connu que PER2 joue un rôle important dans la suppression de tumeurs, peu d'études concernent encore la régulation de l'activation de Per2 par la lumière.

Le projet a comme objectif d'évaluer l'impact de la lumière artificielle dans différentes configurations sur l'expression de Per2 (et d'autres membres de la famille de Per), la division cellulaire, l'angiogenèse et sur le développement tumoral. Ensuite, nous allons essayer de moduler son expression par des activateurs ou inhibiteurs de HSF1 et le monoxyde d'azote.

Afin de mieux comprendre ces processus, nous cherchons à déterminer l'impact de sources de lumière faibles en lumière bleu et en combinaison avec une exposition aux LED en fin de journée sur le rythme circadien, sur la l'activation de transcription de Per2 et de la production de mélatonine, VEGF et la division cellulaire. D'autre part, nous allons moduler l'expression de PER2 par un choc thermique et par blocage de HSF1 et bloquer l'expression d'aaanat2 pour déterminer s'il cela aura des conséquences pour le développement tumoral.

Ces études seront faites chez le poisson zèbre, qui est le modèle idéal pour étudier le fonctionnement du cycle circadien : les horloges périphériques sont directement entrainables par la lumière ce qui facilite la détection de changements d'expression de gènes. La nuit, les poissons sécrètent la mélatonine qui est produite par les gènes aaanat1 et 2. Les rythmes circadiens sont déclenchés tôt dans le développement embryonnaire et sont visibles à partir du jour 2-3. Comme les poissons sont poïkilothermes, on peut élever la température du corps par la température de l'eau. Un facteur qui est très important par rapport aux rongeurs, est le fait que le poisson zèbre est actif le jour comme nous.

Pour ce projet, nous devons générer une lignée avec un gène invalidé et une lignée de contrôle (vecteur de transgénèse qui exprime un gène rapporteur fluorescent comme l'EGFP). Les expériences devront être répétées au moins 3 fois pour chaque point. Nous estimons que nous allons utiliser au plus 6000 embryons/larves en 3 ans. Les larves et les poissons adultes seront euthanasiés à la fin des expériences par surdose de tricaine. Le point terminal pour les larves sera le jour 10 post fécondation (dpf) et chez les adultes, l'âge de 3 ans si le phénotype n'est pas dommageable.

Pour étudier le cycle circadien et les conséquences sur la prolifération cellulaire, nous devons travailler *in vivo*. Nous allons travailler avec des embryons et des larves, parce qu'il semble que les larves n'ont pas de sensation avant le jour 8 post fécondation (d'après les recommandations du NIH, USA). De plus, il est plus facile à ces stades d'observer des organes ou cellules par des méthodes non invasives par imagerie *in vivo*.

7789 Les races avicoles anciennes représentent un réservoir de la biodiversité génétique très précieux pour la préservation des animaux adaptés aux changements des milieux naturels. Ces races sont aussi le patrimoine de l'aviculture régionale et permettent de diversifier les marchés locaux de volaille et alimentent les filières locales à circuit court. Cependant ces races ont des petits effectifs et sont souvent menacées de disparition à cause des problèmes de consanguinité et des épidémies (exemple : grippe aviaire). Dans ce contexte la sauvegarde des ressources génétiques des races patrimoniales présente une urgence. Chez les espèces aviaires une voie commune de préservation des ressources génétiques est la cryopréservation de la semence. Cependant, à la différence des espèces mammaliennes cette technologie ne permet pas la conservation du patrimoine génétique des femelles à cause des particularités génétiques des oiseaux. De plus pour certaines espèces aviaires, il s'avère difficile de mettre en place la conservation de la semence à cause de leurs

particularités physiologiques et comportementales. Les cellules germinales primordiales aviaires (CGPs), qui sont les cellules germinales souches indifférenciées de l'embryon précoce, présentent à ce jour l'alternative et le complément le plus fiable à la congélation de la semence. C'est actuellement l'unique outil disponible pour préserver le patrimoine génétique des femelles. Pour reproduire les animaux à partir des CGPs conservées plusieurs étapes biotechnologiques sont nécessaires. Prélevées chez l'embryon aviaire très précoce, les CGPs sont multipliées *in vitro* et cryopréservées. Après décongélation ces CGPs donneuses sont injectées dans un embryon receveur d'une race différente. Les CGPs donneuses doivent ensuite se développer dans l'organisme receveur (appelé chimère germinale) jusqu'aux gamètes fertiles capables de donner la descendance et de transmettre ainsi le matériel génétique de la race donneuse. Nous avons récemment développé et cryopréservé les cultures *in vitro* des CGPs de la race locale de la Région Centre la Poule Noire du Berry. L'objectif de la présente étude est de tester la compétence germinale de ces CGPs c'est à dire leur capacité à se développer dans une gonade receveuse *in vivo* et donner une descendance viable, en fonction des facteurs des étapes *in vitro* (durée de culture *in vitro*, certains composants du milieu de culture. Pour cela nous allons produire des chimères germinales et leur descendance comme décrit ci-dessus. C'est effectivement le seul test qui permet d'évaluer la capacité procréatrice des CGPs après leur multiplication en culture et cryopréservation. Notre protocole d'expérimentation répond à la règle de 3R :

- Remplacer. Vu qu'il s'agit de tester les cellules germinales primordiales du poulet, l'espèce receveuse la plus adaptée est le poulet et aucun test *in vitro* ne peut remplacer les étapes *in vivo*.
- Réduire. Le nombre d'animaux est réduit au minimum informatif et est basé sur les publications impliquant la production des chimères germinales. Cependant, vu la variabilité des taux de réussite rapportée, la prévision exacte ne peut être réalisée. Nous envisageons d'utiliser maximum 19250 animaux, dont 200 seront mis en élevage après sexage à l'éclosion et 100 animaux seront rentrés à l'état adulte pour la reproduction. Pour réduire le nombre d'animaux élevés en cage, les tests génétiques seront réalisés rapidement dans le mois qui suit la première récolte de la semence sur la semence des coqs pour garder uniquement les chimères pour la reproduction de la descendance. Cela nous permettra de réduire de moitié le nombre maximal de coqs utilisés qui seront élevés en cages.
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions similaires à celles des poulets d'élevage et le placement en cage individuelle est limité à la période nécessaire.

7790 La recherche médicale en endocrinologie, en cardiologie, en oncologie et dans bien d'autres domaines fait appel à des modèles animaux qui prévoient des interventions chirurgicales. La chirurgie est un domaine d'expertise qui fait appel à la dextérité du chirurgien et à une bonne planification des gestes, ainsi qu'à une bonne organisation de l'équipe qui aide le chirurgien. D'autre part, pour obtenir des résultats expérimentaux comparables, les chirurgies des animaux doivent être effectuées de façon identique, en réalisant les mêmes gestes, afin de pouvoir comparer les animaux les uns avec les autres. La qualité de la chirurgie, sa préparation et sa répétabilité peuvent nécessiter le recours à des animaux vivants sous anesthésie générale pour que le chirurgien s'entraîne et peaufine tous les détails de ses procédures. Evidemment, ce travail sur animaux vivants fait suite à des entraînements sur du matériel inerte, des pièces anatomiques, voire des corps d'animaux morts, issus d'autres projets expérimentaux.

Dans le cadre de ces mises au point et entraînements, nous pensons recourir à l'animal aussi rarement que possible. Cependant, en fonction de notre activité et des demandes qui nous seront faites par les équipes de recherche, nous pensons utiliser sur les 5 ans qui viennent 800 rongeurs, 100 lagomorphes, 20 chiens, 20 furets, 100 porcs/mini-porcs et 40 ruminants. Si notre activité est inférieure, nous n'utiliserons pas la totalité des animaux prévus. Toutes les phases de mise au point et entraînement seront effectuées avec des animaux anesthésiés, avec une couverture analgésique importante. Les chirurgies seront réalisées par des vétérinaires spécialistes de ce domaine et dans un environnement très bien équipé pour le soin et l'anesthésie des animaux. Dans la plus grande majorité des cas, les animaux ne seront pas réveillés. Il s'agira, autant que possible d'animaux déjà utilisés à des fins scientifiques dans d'autres projets, et pour lesquels il est nécessaire de procéder à une euthanasie. Dans ce cas, à l'occasion de cette fin d'étude, les animaux seraient utilisés pour le

projet de cette demande, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Si les animaux sont acquis spécifiquement pour notre projet, ils seront tout d'abord acclimatés, hébergés en groupes sociaux avec un hébergement adapté à leurs besoins physiologiques et manipulés par du personnel compétent.

7791 Ce projet s'attache à comprendre le rôle d'une protéine X dans le développement de la fibrose pulmonaire, et plus particulièrement à comprendre ses fonctions dans le phénomène de remodelage tissulaire.

La fibrose pulmonaire est une lésion des poumons caractérisée par une fibrose, c'est-à-dire la présence d'un excès de tissus cicatriciel entraînant une diminution irréversible des capacités respiratoires. La fibrose pulmonaire est la conséquence de diverses pathologies, mais ne possèdent à ce jour aucun traitement curatif disponible. A ce jour, le seul traitement consiste à prévenir l'aggravation de la maladie, et nécessite donc de trouver de nouvelles approches thérapeutiques.

La protéine X s'est révélée au cours de ces années avoir des propriétés anti-fibrinolytique, anti-thrombotiques et anticoagulantes. Cette étude a pour but, de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette protéine X dans les phénomènes de remodelage tissulaire via ses propriétés récemment démontrées. Potentiellement et à plus long terme, la modulation de cette protéine pourrait être envisagée à des fins thérapeutiques, afin d'améliorer par son inhibition ou sa suractivation, l'état des patients atteint de fibrose.

A ce jour, il n'existe pas de méthodes alternatives à l'utilisation de souris pour modéliser le développement de la fibrose pulmonaire, du fait de la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeux. Le projet met en jeu des approches intégrées sur animal entier et des explorations fonctionnelles sur animal vigile qui ne peuvent pas être substituées par des approches *in vitro*.

Cependant, ce projet est complété par des approches mécanistiques en culture cellulaire. De plus nous ferons appel à des techniques permettant l'analyse de plusieurs paramètres sur un même prélèvement comme l'analyse d'ARN et des protéines à partir des mêmes prélèvements.

Pour cette étude nous aurons ainsi besoin d'utiliser 800 souris au total. Ce nombre est expliqué par le fait que seuls les mâles homozygotes sont utilisés. En effet, les souris sont issues de croisements hétérozygotes ne permettant d'obtenir qu'1/8ème de souris homozygotes et seuls les mâles développent le phénotype pathologique. La pathologie humaine de la fibrose pulmonaire affectant les adultes nous utiliserons des souris de 8 à 12 semaines.

De plus, pour répondre à des questions de biologie cellulaire et moléculaire, nous utiliserons des cultures primaires, ce qui réduit fortement l'utilisation d'animaux. Cependant, les cultures cellulaires ne peuvent pas remplacer les études *in vivo* pour les réponses physiopathologiques à une manipulation génétique ou traitement pharmacologique. Les expériences seront faites dans le respect des 3R, les animaux seront suivis par du personnel compétent, maintenus sans isolement et avec enrichissement. Tout signe de souffrance sera pris en charge avec l'utilisation d'analgésiques et les points limites bien définis.

A terme, ces résultats permettront donc de mieux comprendre les mécanismes de remodelage tissulaire dans la fibrose pulmonaire, permettant peut-être dans l'avenir le développement d'agents thérapeutiques impliquant la protéine que nous étudions.

7792 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 120 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 (toiletage, 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.

7793 Le développement des médicaments vétérinaires à destination des espèces dont la chair ou les productions peuvent être consommées par l'homme nécessite d'étudier la déplétion des résidus de ces médicaments dans les différentes parties consommables. Ces études de déplétion des résidus permettent ensuite de déterminer des temps d'attente, qui représentent le délai à respecter entre la dernière administration du médicament et la consommation sans risque pour le consommateur des denrées issues de l'animal traité.

Les études de déplétion des résidus dans le lait qui constituent ce projet vont permettre d'étudier et de caractériser les résidus de médicament vétérinaire après administration par voie orale à des vaches laitières. Les conditions d'administration du médicament sont celles recommandées dans les conditions normales d'utilisation, à la dose et pendant la durée de traitement maximales recommandées.

La présence de résidus de médicament dans le lait et leur déplétion en fonction du temps seront déterminées en analysant les échantillons de lait récoltés après traitement, lors des traites successives. Le rythme de traite des vaches traitées s'approchera le plus possible des pratiques rencontrées dans les différents systèmes d'élevage. Les études de déplétion des résidus dans le lait en vue de la détermination d'un temps d'attente constituent une étape du développement préclinique réglementaire des médicaments destinés aux vaches laitières. Elles sont réalisées d'après les lignes directrices en vigueur, qui définissent le nombre minimal d'animaux requis ainsi que le schéma expérimental le plus adapté à la finalité de l'étude. Ces études doivent être réalisées dans l'espèce de destination ; le recours à la vache laitière, en tant qu'espèce de destination, ne peut donc être évité.

La réalisation des études de résidus dans le lait ne nécessite aucune euthanasie et les animaux utilisés peuvent donc être réutilisés. Cette réutilisation est envisageable en fonction du médicament administré, de la durée et de l'espacement des études.

Le nombre total de vaches laitières nécessaire à la réalisation de ce projet est variable en fonction du nombre d'études réalisées et de la réutilisation des vaches laitières, sans toutefois excéder 200 animaux sur 5 ans.

Les vaches laitières participant à ce projet seront hébergées dans leur cadre de vie habituel, alternant des passages en stabulation et des passages en pâtures à l'extérieur. Pendant le déroulement des études de déplétion des résidus dans le lait, les conditions habituelles d'élevage seront maintenues et notamment la ration (composition et distribution), les conditions de traite et les conditions d'hébergement afin de ne pas engendrer de stress additionnel.

7794 Notre laboratoire de recherche fondamentale souhaite identifier les fonctions d'une classe de molécules trouvée dans toutes les cellules vivantes : les longs ARN non-codant (lncRNA). Les cellules humaines produisent plus 3000 lncRNA différents. Jusqu'à récemment, ces molécules ont été très peu étudiées et pour la plupart, leur fonction reste donc inconnue. Cependant, la dérégulation d'un grand nombre d'entre eux a été associée à certaines pathologies humaines, comme les cancers, le diabète et les maladies neurodégénératives. Ces implications nous encouragent à étudier ces molécules. En effet, comprendre leur fonction dans un contexte sain pourra permettre d'identifier les conséquences de leur dysfonctionnement dans un contexte pathologique. A terme, ces connaissances conduiront à une meilleure compréhension des pathologies humaines et pourraient ouvrir de nouvelles options thérapeutiques.

Pour étudier la fonction *in vivo* des lncRNA, nous utilisons le poisson zèbre, un vertébré inférieur qui est un modèle d'étude courant pour comprendre et analyser de nombreux processus physiologiques et pathologiques humains (cancer, diabète, embryologie...). Nous proposons d'étudier 30 lncRNA conservés du poisson zèbre à l'homme. Notre approche consiste à créer des modifications génétiques pour que les poissons ne produisent plus les lncRNAs d'intérêt. Les lignées modifiées seront ensuite observées afin d'identifier les différences physiques, comportementales et/ou physiologiques par rapport aux poissons sauvages. Le nombre total d'animaux prévus pour cette étude de 5 ans est de 9280 individus.

Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacement : Les études sur lignées cellulaires permettent de répondre à certaines questions scientifiques, mais elles ne rendent pas compte des interactions complexes qui existent au sein d'un organisme entier. C'est pourquoi, en plus de nos études en cultures cellulaires, nous souhaitons poursuivre notre étude chez un animal modèle des vertébrés : le poisson zèbre. Nous avons choisi d'utiliser cette espèce inférieure, comme première étape de l'étude *in vivo* des lncRNAs.

Réduction : Nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Aucune expérimentation sur les animaux n'est prévue dans ce projet. Les lignées seront uniquement observées et les individus utilisés principalement pour le maintien des lignées, dont le phénotype attendu est encore inconnu. La population adulte de poissons utilisée pour produire les embryons est ainsi restreinte pour limiter le nombre d'animaux mais suffisamment développée pour assurer des conditions de reproduction efficaces pour les études envisagées.

Raffinement : Nous nous appliquerons à réduire la souffrance, la douleur et l'angoisse. Toutes les analyses sur tissu seront conduites après euthanasie d'animaux. Dans chaque cas, nous suivrons les signes visibles d'un animal souffrant et procéderons si nécessaire à une euthanasie. Concernant l'élevage, les poissons trop vieux pour la ponte ou présentant des signes de maladie seront euthanasiés afin d'éviter tout risque de souffrance.

7795 Le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) sert de modèle pour l'étude de la multiplication des virus appartenant à l'ordre des Mononegavirales, parmi lesquels on retrouve des virus pathogènes comme les virus de la rage, de la rougeole ou Ebola.

Contre le virus Ebola il n'existe pas de traitement homologué, (un vaccin est en cours d'essai), le taux de mortalité va de 25 % à 90 % chez l'humain; l'épidémie qui a sévi en Afrique de l'Ouest en 2014 et 2015 a causé 11 323 morts sur 28 646 cas recensés. Particulièrement dangereux, ce virus ne doit être manipulé qu'au sein de laboratoires P4 (ou BSL-4), conçus pour prévenir les risques de contamination par accident ou à la suite d'actes de malveillance. La rage et la rougeole sont certes moins dangereuses mais pas inoffensives et les manipuler demande aussi des mesures de confinement pour limiter les risques. C'est une des raisons pour laquelle nous étudions le pouvoir pathogène de VSV, en tant que modèle de virus plus dangereux. La seconde raison est que le VSV

peut être modifié génétiquement pour inclure une protéine d'un autre virus (la rage par exemple) pour servir de vaccin recombinant, plus efficace qu'un vaccin fait avec le virus d'origine.

Le VSV est l'agent d'une maladie bénigne, la stomatite vésiculaire qui touche le bétail, les chevaux et les porcs en Amérique : fièvre, salivation excessive, lésions vésiculaires au niveau de la bouche, des pis et des sabots. Les épidémies de stomatite vésiculaire ont des conséquences économiques importantes puisque les animaux ont des difficultés à se nourrir et à se mouvoir, entraînant ainsi une perte de poids et un arrêt de la lactation. En cas d'éventuelle transmission à l'homme, les symptômes sont de type grippaux, avec parfois des lésions sur les mains, même si le plus souvent l'infection est asymptomatique. C'est donc aussi pour obtenir des vaccins recombinants dénués de ce pouvoir pathogène résiduel, que nous étudions le VSV.

L'objectif de ce travail est d'étudier le rôle de la polymérisation de la phosphoprotéine du VSV lors de la transcription et la réplication virale.

Remplacer : Dans un premier temps, nous avons caractérisé par des méthodes biophysiques un mutant de délétion du domaine de polymérisation de la phosphoprotéine. De plus, nous avons confirmé le comportement sous forme de monomère de ce mutant en utilisant la méthode de double-hybride. Enfin, en culture de cellules nous n'avons pas observé de différences dans le taux de réplication virale. Nous devons maintenant utiliser des souris pour évaluer si ce domaine de polymérisation de la phosphoprotéine joue un rôle dans l'infection virale.

Raffiner : par la mise en place de points limites adaptés et d'un score clinique, les animaux seront euthanasiés avant que la maladie ne soit trop grave pour eux. Nous observerons la progression du virus muté après infection, et déterminerons son pouvoir pathogène. La procédure sera classée sévère car les rongeurs sont très sensibles à ce virus, ce qui est un atout pour détecter le pouvoir pathogène du mutant. Des douleurs sont qualifiées de légères à modérées et qui seront soulagés par l'utilisation des antalgiques dans l'eau de boisson des souris.

Réduire : nous allons utiliser 76 souris. Les doses de virus seront établies sur des effectifs restreints, l'expérience principale sera faite avec les effectifs les plus petits qui permettent d'avoir une conclusion valide. Le nombre de 76 souris ne sera pas dépassé et a été divisé par deux. Nous ne pouvons pas effectuer des expériences d'une manière séquentielle et en escalade car ceci nous expose à des variabilités d'une infection à l'autre due à la susceptibilité des souches de souris infectées et/ou la baisse de la virulence du virus VSV à chaque décongélation. En plus, le protocole expérimental sera rallongé de 5 fois par rapport au protocole initial.

7796 Les fentes labio-palatines représentent la malformation congénitale crânio-faciale la plus fréquente dans la population générale (1/700 naissances toutes formes confondues). Le traitement chirurgical de cette pathologie doit être entrepris à un âge précoce (4 à 6 mois de vie) afin de limiter au maximum les troubles de croissance notamment pour la déglutition, pour la respiration et pour le développement de la phonation de l'enfant. Cependant, et ce malgré l'amélioration constante des techniques chirurgicales, on retrouve presque toujours un défaut de croissance du maxillaire dû aux tissus cicatriciels engendrés par la chirurgie. Se pose alors un paradoxe croissance/fonction qu'il est bien difficile à résoudre. L'implantation d'un biomatériau de comblement, composé d'un substitut osseux et de cellules, constituerait une nouvelle solution thérapeutique dans la prise en charge des fentes labio-palatines.

Nous avons lors d'un précédent travail, réalisé une étude de faisabilité d'un modèle orthotopique de fente palatine chez le rat. Nous avons pu optimiser le geste chirurgical, vérifier l'absence d'infection au niveau du site opératoire et d'une cicatrisation complète du défaut après 1 mois. Nous avons pu nous assurer de la survie et de l'absence de souffrance de l'animal tout au long de l'étude. Notre modèle permet de reproduire les séquelles d'une fermeture de fente palatine humaine chez le rat en croissance (âgé de 8 semaines).

Des études récentes démontrent la faisabilité de ce modèle chez le rat. Cependant, les matrices testées jusqu'à présent dans ce type de modèle, n'ont pas permis d'améliorer le processus de consolidation. Dans le cadre d'une collaboration industrielle, nous avons développé de nouvelles matrices pour lesquelles nous avons défini *in vitro* les conditions de viabilité des cellulesensemencées dans ces matrices. *In vivo*, les propriétés de reconstruction osseuse des substituts osseux varient non

seulement en fonction des populations cellulaires implantées mais aussi en fonction du site d'implantation. Les méthodes alternatives ne permettent pas d'évaluer ces propriétés fonctionnelles. C'est pourquoi nous testerons deux types de matrices, en présence ou non de cellules souches mésenchymateuses (CSM) de rat, à reconstituer des pertes de substance osseuse au niveau d'un palais en croissance et en conditions septiques.

L'intérêt de notre modèle est double : développer un modèle murin mimant la pathologie humaine pour valider la faisabilité de réaliser des essais chez l'homme et évaluer les propriétés ostéoconductrices de nos matrices.

La demande d'autorisation porte sur une durée de 5 ans avec un nombre de rats nécessaires (Sprague-Dawley) égal à 150. Ce nombre est le plus faible possible au regard du taux de mortalité observé de 20% lors de l'étude de faisabilité et afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Toutes les démarches réglementaires seront entreprises pour que ces travaux soient réalisés dans les meilleures conditions pour les animaux. Les rats bénéficieront d'un hébergement de confort optimal, d'une anesthésie générale par kétamine-xylazine après acclimatation, d'une antibioprofylaxie par amoxicilline en post opératoire précoce, d'une prise en charge de la douleur par buprénorphine et d'un suivi régulier de leur bien-être en post-opératoire. L'euthanasie de l'animal sera réalisée selon les règles de bonnes pratiques par inhalation de dioxyde de carbone à 12 semaines post-opératoire. L'évolution de la reconstruction osseuse sera évaluée régulièrement par microtomographie. Après euthanasie, la zone opérée sera prélevée, une partie sera incluse en paraffine pour analyse histologique. Nous réaliserons sur l'autre partie une analyse dynamique histomorphométrique au microscope à fluorescence. Ceci afin d'évaluer la composition cellulaire de la zone d'intérêt, l'ostéogénèse et la qualité de l'ostéointégration des biomatériaux.

7797 L'œsophagectomie est une intervention consistant en une ablation partielle ou totale de l'œsophage. Ce traitement est indiqué en cas de tumeur maligne, parfois bénigne, et plus rarement en cas de détérioration de l'œsophage due à une inflammation ou à une brûlure par absorption de produits caustiques. Cette chirurgie est responsable de 5% de mortalité post opératoire, et 50% des patients sont atteints de complications post opératoires (sténose, fibrose au niveau de l'anastomose, dysphagies, troubles alimentaires) ce qui entraîne une diminution importante de la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de trouver des solutions alternatives pour remplacer l'œsophage manquant et diminuant ces complications post-opératoires, telles que le développement des matrices œsophagiennes.

L'objectif du projet est d'étudier l'efficacité et la tolérance d'un dispositif œsophagien (sans ensemencement cellulaire, avec ensemencement *in vitro*, et avec maturation intra-abdominale avant implantation).

Ces études seront réalisées sur animaux vivants, car ce protocole de suivi post opératoire nécessite d'utiliser un animal vivant. Le porc a été retenu car la structure de l'œsophage et sa taille sont très proches de ceux rencontrés en clinique humaine. Aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Ces études vont nécessiter de travailler sur maximum 39 porcs, nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des porcs, en limitant leur stress par un hébergement adapté et en les manipulant par du personnel spécialement formé à cette espèce. En post opératoire, un suivi antalgique et anti-inflammatoire adapté sera mis en place pour compenser l'inconfort lié à la chirurgie. Une alimentation adaptée de type soupe sera aussi proposé.

7798 L'objectif de ce projet est de préparer, pour la communauté scientifique française et européenne, des modèles de cathétérisation chez le rat ou la souris.

Ces modèles animaux sont destinés :

- Aux études de pharmacocinétiques : ce sont des études de toxicité au cours desquelles de nombreux prélèvements de sang (ou de bile ou d'urine) seront à faire à différents intervalles pour doser les produits administrés dans le sang (ou bile / urine).

- Aux études pharmacologiques et toxicologiques spécifiques du cerveau, par la pose de canules qui permettront une administration de produit au contact direct des tissus d'intérêt. Un modèle de canulation permet en plus, le prélèvement de LCR.

- A d'autres études qui nécessiteront de faire des injections régulières dans lesquelles l'utilisation d'un cathéter est indispensable.

Ces modèles seront ensuite utilisés dans les domaines de la recherche fondamentale et des études précliniques afin de contribuer au développement de médicaments.

Les cathétérisations permettent des injections et/ou des prélèvements répétés tout au long de l'étude, sans anesthésie, et minimisant le stress provoqué par des manipulations répétées.

Les animaux utilisés sont hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre et à l'âge ou au poids. Ils évoluent dans un milieu enrichi et des points limites sont appliqués.

Les études précliniques sur rongeurs opérés permettent d'étudier les réactions de l'organisme et les différentes réactions immunitaires après administration des produits à tester, donc les traitements associés ne peuvent pas être étudiés *in vitro*. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés et par conséquent ne peuvent pas être étudiées *in vitro* sur un seul type de cellule.

Les chirurgies sont réalisées selon des procédures standardisées et adaptées aux spécificités de souche, sexe, âge et poids.

Le bien-être animal est une priorité : L'injection d'un analgésique en péri-opératoire est réalisée pour contrôler la douleur. Toutes les interventions sont réalisées sur animaux anesthésiés, qui sont préalablement préparés de manière aseptique pour l'intervention. Les soins post-opératoires sont réalisés sur les animaux avec un suivi clinique et l'administration d'antidouleur. Les points limites sont définis en fonction des spécificités du modèle. Les animaux sont observés tous les jours.

Basé sur les années précédentes, le nombre d'animaux destiné à des chirurgies de cathétérisation est de 2120 animaux par an (soit 2050 rats et 70 souris).

Le projet étant prévu pour 5 ans, il est estimé à 10600 animaux (soit 10250 rats et 350 souris).

7799 Le processus fibrotique, c'est-à-dire la formation excessive de tissu conjonctif fibreux en réponse à une atteinte tissulaire souvent inflammatoire, est à l'origine de nombreuses maladies dites 'fibroses'. Elles se traduisent par une rigidité anormale des organes (poumon, foie, rein, cœur...) pouvant avoir à terme, des conséquences létales. Parmi les besoins médicaux que nous avons identifiés, la fibrose pulmonaire idiopathique (IPF), qui touche environ 17000 personnes en France et 3 millions dans le Monde, est une maladie limitant l'espérance de vie des patients à moins de 2 ans après le diagnostic. Le traitement actuel des stades légers à modérés repose sur deux molécules dont l'efficacité reste insatisfaisante. Ces traitements ralentissent la progression de la cicatrisation des poumons, mais n'atténuent pas toujours les symptômes de la toux et de l'essoufflement.

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

L'évolution des néphropathies chroniques, indépendamment de leur origine, est marquée par le développement progressif de lésions fibrotiques rénales, conduisant les patients à une insuffisance rénale terminale.

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

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

les cellules épithéliales et les cellules immunitaires. Dans ce but, et en nous appuyant sur les données de la littérature, nous souhaitons développer des modèles de fibrose chez la souris et le rat.

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

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

Le nombre total d'animaux qui pourraient entrer dans ce projet serait de 15700 sur une période de 5 ans. Tous les candidats médicaments ne seront pas testés dans tous les modèles de fibrose ; ainsi ce nombre maximum ne sera pas atteint.

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

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

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

7800 Le fonctionnement cérébral nécessite un équilibre entre les circuits neuronaux excitateurs et inhibiteurs. Nous nous intéressons particulièrement à ces neurones inhibiteurs. Des études ont montré chez des enfants autistes que certains de ces neurones sont défaillants. Chez l'adulte des anomalies de ces neurones ont été détectées chez des patients schizophrènes. Enfin, au cours du vieillissement cérébral, l'activité de ces neurones diminue parallèlement au déclin cognitif. Il est donc primordial de mieux comprendre à la fois ce qui régule le fonctionnement de ces neurones au cours du développement et chez l'adulte, mais aussi les conséquences de leurs dysfonctions.

Le laboratoire travaille sur les gènes *Dlx* qui régulent le développement, la maturation et la fonction de ces neurones. Pour ce projet, nous allons utiliser une lignée de souris permettant de modifier le niveau d'expression de gènes impliqués dans la régulation des neurones inhibiteurs dans le système nerveux central.

Le fonctionnement cérébral est un processus complexe qui ne peut être ni modélisé, ni reproduit en culture ce qui rend inévitable de réaliser ces expériences chez l'animal. Effectuer ces observations chez la souris, en particulier, permet l'approche génétique nécessaire à l'étude du fonctionnement du cerveau, tout en présentant une structure cérébrale proche de celle de l'homme.

Dans le but de mieux comprendre la fonction des gènes *Dlx* dans le fonctionnement cérébral nous proposons d'établir une nouvelle lignée de souris chez laquelle la protéine *Dlx* sera produite en quantité plus importante que la normale pour en étudier les conséquences. Cette procédure ne nécessite pas de modifier le génome de souris, mais de croiser deux lignées déjà existantes, qui séparément n'ont pas de phénotype, mais dont la combinaison entraînera la surexpression de *Dlx*. Ces expériences ne sont pas, à priori, de nature à provoquer de la douleur chez les animaux. Cependant, ces croisements étant réalisés pour la première fois, les premiers animaux de cette lignée seront observés quotidiennement dès leur naissance et jusqu'à ce qu'on se soit assuré que leur phénotype n'est pas délétère, puis au moins une fois par semaine pendant toute la durée de leur vie pour prévenir et réduire le stress qu'ils pourraient ressentir. Si, contrairement à ce qui est attendu, les animaux présentaient une souffrance, l'expérience serait interrompue et le projet fondamentalement modifié. D'une manière générale, les souris sont hébergées dans des conditions optimales : par

fratries du même sexe dans des cages de surface au minimum égale aux recommandations en vigueur, avec nourriture et eau à volonté et présence d'igloos et de cotons pour confectionner un nid.

Une fois les animaux générés, la procédure expérimentale du projet a deux aspects : le premier consiste à observer le comportement des souris lors de tests simples faisant appel aux attitudes naturelles de la souris : évolution dans un espace ouvert, recherche de nourriture, attitude vis-à-vis d'objets présents dans la cage, comportement alimentaire et social.

L'autre aspect consiste à évaluer d'éventuelles modifications dans les neurones du système nerveux central. Ces expériences sont menées sur des coupes de cerveaux post-mortem et ne nécessitent aucune expérimentation préalable.

Dans le but de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ces études neuroanatomiques, chaque prélèvement effectué sera scindé en plusieurs séries dans le but de réaliser plusieurs observations différentes sur le même échantillon et ainsi minimiser le nombre d'animaux euthanasiés. Cependant, de nombreux animaux de chaque lignée seront nécessaires pour réaliser l'ensemble des études du projet. Nous estimons le nombre total des animaux à une centaine sur la durée totale, de 2 ans, du projet. Si les objectifs de l'étude sont atteints plus tôt, le nombre total d'animaux impliqués pourra être réduit. Toutes les études décrites seront réalisées avec des souris adultes (3-12 mois) des deux sexes.

Les connaissances nouvelles que nous produirons, outre des avancées dans la compréhension du fonctionnement cérébral, pourraient permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques qui permettraient de rééquilibrer des anomalies de fonctionnement cérébral et soulager les symptômes de certains troubles mentaux chez l'homme.

7801 Parmi les hépatites virales, la lutte contre le virus de l'hépatite B (HBV) a connu une importante avancée dans les années 1980 avec la mise au point d'un vaccin ainsi que la campagne de vaccination massive qui a suivi dans les pays développés toutefois environ 10% des sujets restent insuffisamment couverts malgré la vaccination et des foyers endémiques d'hépatite B persistent notamment en Chine. Ainsi 350 millions de personnes sont atteints d'hépatite B chronique à travers le monde, 1 million de décès par an étant attribués à ses conséquences, cirrhose hépatique et cancer du foie. Aucun traitement ne permet à ce jour d'éradiquer la maladie.

Notre programme de recherche vise à développer de nouvelles molécules actives contre le virus de l'hépatite B selon un nouveau mode d'action permettant de lutter contre le caractère chronique de ces hépatites. Après une évaluation *in vitro* de l'efficacité des nouvelles molécules par des techniques de cultures cellulaires, les molécules les plus actives seront évaluées *in vivo*.

Les espèces susceptibles naturellement au virus de l'hépatite B sont limitées à l'homme et au primate non humain. Afin d'éviter l'expérimentation sur des gros animaux (singe), un modèle de souris transgéniques, rendues sensibles au HBV par humanisation de leur foie a été développé. Dans ce modèle, la modification génétique entraîne la disparition des hépatocytes murins qui sont remplacés par des hépatocytes humains. Ce modèle techniquement sophistiqué oblige à l'utilisation d'un nombre restreint d'animaux spécialement dédiés à ces études.

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

Afin de limiter l'inconfort que peuvent induire nos expérimentations, nous avons établi une liste de points limites au-delà desquels, les traitements seraient suspendus ou arrêtés.

Pour chaque procédure expérimentale, un programme d'analgésie est mis en place à chaque fois que cela est nécessaire. Les gestes chirurgicaux sont pratiqués sur tapis chauffants et les animaux surveillés jusqu'à leur réveil.

Durant tout le temps de leur hébergement, un enrichissement des conditions d'hébergement est appliqué avec ajout de jouets dans les cages.

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

L'ensemble des animaux qui seront utilisés pour la mise en œuvre de ce projet a été évalué à 1600 souris sur 5 ans.

7802 Les zygomycozes sont des mycoses opportunistes qui concernent les patients immunodéprimés, diabétiques ou ayant des facteurs de risque de développement de pathologies infectieuses opportunistes. Ces zygomycozes sont particulièrement difficiles à traiter du fait notamment du terrain du patient mais aussi du faible nombre de molécules efficaces.

Notre équipe de recherche développe, depuis plus de 10 ans, de nouveaux antifongiques. Certains ont montré une excellente activité comme anti-Candida et anti-aspergillaire *in vitro* mais aussi dans les modèles murins correspondant. Afin de confirmer l'étendue de leur spectre d'action, une étude de l'activité sur les zygomycètes doit être réalisée. Nous devons donc développer au laboratoire un modèle murin de zygomycose. Plusieurs modèles sont décrits dans la littérature. Ces études utilisent, pour la plupart, des souris soit neutropéniques après traitement au cyclophosphamide soit diabétiques après traitement à la streptozocine.

Dans ces conditions, la première procédure visera à déterminer lequel des deux modèles sera le plus pertinent pour l'étude de l'activité antifongique sur les zygomycètes en déterminant la charge fongique minimale à administrer par voie trachéale pour conduire à une infection létale. (Maximum 400 souris)

La seconde procédure a pour objectif la détermination de la dose de traitement de référence (amphotéricine B) nécessaire à la survie des animaux. (Maximum 400 souris)

La troisième procédure permettra d'évaluer l'activité des molécules sélectionnées sur leur activité *in vitro* sur *Rhizopus arrhizus*. (Maximum 750 souris)

Au total, au maximum, 1550 animaux seront utilisés.

Les souris sont hébergées en groupe, dans un environnement enrichi. Les protocoles expérimentaux ont été établis de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en choisissant d'évaluer uniquement les nouveaux antifongiques ayant fait la preuve de leur activité *in vitro*. Le suivi de l'évolution de la maladie par la recherche dans le sang des champignons ainsi que l'évaluation de la charge fongique dans les organes cibles permettent d'améliorer la qualité de l'étude de l'activité antifongique et donc de raffiner nos procédures. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'autres méthodes d'évaluation de l'activité antifongique pour le traitement de zygomycozes que l'étude sur des animaux rendant actuellement leur remplacement impossible.

La durée maximale du traitement est de 5 jours. La souffrance animale est évaluée au cours du suivi quotidien de l'évolution clinique des animaux. Tout animal manifestant un "score de points critiques" dépassant le seuil défini est euthanasié.

7803 Les glaucomes regroupent un ensemble de pathologies de la rétine qui constitue la deuxième cause de cécité dans le monde. En effet, la dégénérescence d'un type de cellules nerveuses, les cellules ganglionnaires, conduit à une perte progressive de la vision chez les patients. La préservation de ces cellules ganglionnaires représente une approche thérapeutique prometteuse. Notre projet vise ainsi à définir le rôle de CYP46A1, enzyme clé du métabolisme du cholestérol spécifiquement exprimée dans les cellules ganglionnaires, dans leur mort au cours du glaucome. Pour cela, la stratégie choisie consiste à déterminer l'impact d'une inhibition de l'expression de l'enzyme CYP46A1 sur l'évolution d'un glaucome expérimental chez le rat. La rétine étant composée de l'association de nombreux types cellulaires qui interagissent de façon coordonnée, seul un modèle animal peut permettre de répondre à cet objectif. Plus précisément, le rat est une espèce bien adaptée à ces recherches en ophtalmologie. Sa rétine se compose des mêmes populations cellulaires que la rétine humaine et son œil est d'un abord facile permettant d'apporter des composés à la rétine par injection intra vitréenne et de mimer expérimentalement un glaucome. De plus, l'investigation de la structure et de la fonction rétinienne sont maîtrisées au laboratoire.

Le projet comprend trois phases, dont les deux premières sont des étapes de validation de méthodes destinées à optimiser le modèle expérimental de glaucome d'une part (144 animaux) et le modèle

d'inhibition de l'expression de CYP46A1 d'autre part (384 animaux). Elles constituent des préalables nécessaires à la troisième et dernière phase qui consiste à évaluer les effets de l'inhibition de CYP46A1 sur la mort des cellules ganglionnaires en réponse à un glaucome expérimental (480 animaux). Le nombre total d'animaux nécessaires s'élève à 1008. Plusieurs éléments sont mis en place pour répondre au principe de réduction du nombre d'animaux utilisés tout en évitant de compromettre l'obtention de résultats statistiquement significatifs : i) l'utilisation d'un test non paramétrique pour le traitement des données limitant le nombre de réplicas nécessaires, ii) la prise en compte des résultats obtenus antérieurement et de la variabilité couramment observée dans l'équipe sur des modèles ou techniques similaires permettant de définir le nombre d'yeux nécessaires (8 ou 10) en fonction des analyses, iii) les deux procédures préliminaires permettant de limiter les analyses de la troisième procédure à 2 temps pertinents et d'optimiser les conditions expérimentales, limiter la variabilité et ainsi maximiser les chances de réussite de cette procédure principale.

Tous les animaux seront suivis par un personnel compétent dans le respect de la charte nationale sur l'éthique de l'expérimentation animale. Ce suivi se fera à trois niveaux : i) observation quotidienne des conditions d'hébergement, ii) examen hebdomadaire de l'état clinique de chaque animal, et iii) suivi spécifique déterminé par les procédures expérimentales (anesthésie et interventions au niveau des yeux). Les animaux seront manipulés afin de réduire au maximum toute douleur et détresse. Au quotidien, leur environnement sera amélioré par l'utilisation d'enrichissement de type tunnel et bâton à ronger. La souffrance liée aux procédures expérimentales sera évitée par l'utilisation d'anesthésiques et d'analgésiques adéquats. De plus, toute intervention sera limitée à un seul œil par animal dans le respect des directives d'utilisation des animaux dans la recherche en vision et ophtalmologie.

7804 Avec près de 9 millions de décès par an recensés en 2015 (OMS, 2017) le cancer est une cause majeure de mortalité dans le monde. Malgré l'amélioration de la prévention et le développement de nouveaux traitements, le cancer continue de progresser. La formation de métastase et donc la colonisation de site distant de la tumeur primaire sont la cause majeure de mortalité. Le processus métastatique est initié lorsque les cellules tumorales se détachent d'une tumeur primaire, entrent dans la circulation sanguine pour envahir d'autres organes, les cellules tumorales sont alors à l'origine des tumeurs secondaires, appelées les métastases.

Outre leur rôle dans l'hémostase c'est à dire l'arrêt des saignements, les plaquettes sanguines participent à la dissémination métastatique. Si les mécanismes impliqués ne sont pas clairs, des études suggèrent que ces dernières protégeraient les cellules cancéreuses circulantes du système immunitaire, faciliteraient l'adhérence des cellules tumorales aux vaisseaux sanguins et leur passage dans au site secondaire.

Il a également été suggéré que le facteur de Willebrand, présent sur la paroi vasculaire et ligand des plaquettes, participent à ce processus.

Cette étude a pour but de mieux comprendre le rôle des plaquettes et du facteur de Willebrand dans la formation de métastases tumorales afin de pouvoir imaginer de nouveaux traitements anti-métastatiques.

Nous utiliserons au maximum 600 animaux (souris, *Mus musculus*) pour cette étude qui sera réalisée de façon séquentielle. Les résultats obtenus seront évalués et analysés à chaque étape avant la poursuite les expériences et l'utilisation d'autres animaux.

Le facteur de Willebrand jouant un rôle dans les étapes précoces, les cellules tumorales seront injectées dans la circulation sanguine des animaux et l'impact de ce facteur sera évalué à différents temps (15 min, 30 min, 1h, 2h, 4h et 24h). Le rôle des plaquettes sera évalué par l'induction d'une thrombopénie (diminution du compte plaquettaire) via l'injection d'un anticorps spécifique. De plus, l'étude du rôle du facteur Willebrand reposera sur l'utilisation d'une lignée de souris déficiente pour ce facteur. L'adhérence à la paroi vasculaire et la survie des cellules tumorales sera ensuite évaluée par des techniques d'immunomarquages.

Remplacer

Les études sur le rôle des plaquettes et du facteur de Willebrand dans les métastases nécessitent d'utiliser des animaux car elles impliquent des interactions complexes entre les différents organes,

la circulation sanguine et le système immunitaire qui ne peuvent pas être modélisées *in vitro*. En revanche, toutes les études d'interaction plaquettes cellules tumorales seront effectuées *in vitro*.

Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant une analyse statistique avec le t-test de Student ou de Mann Whitney. Pour une expérience, un groupe contrôle de 5 souris et un groupe de 5 souris déficientes sera utilisés et cela pour chaque temps déterminé et pour les 3 modèles de lignées cellulaires envisagés. Les expériences seront réalisées en triplicat afin de consolider statistiquement les résultats. Les résultats seront analysés après chaque expérience et la poursuite de l'étude sera évaluée afin de limiter le nombre d'animaux, si les premiers résultats ne se révèlent pas convainquant.

Raffiner

Le modèle animal est choisi dans le but de reproduire, le plus fidèlement possible la pathologie étudiée et d'en tirer le maximum d'informations. Les conditions du travail seront raffinées en utilisant des modèles aigües (sur quelques heures), plutôt que des modèles génétiques qui durent plusieurs mois et ainsi limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux procédures expérimentales. Des points limites seront évalués après les injections et pendant la durée de l'expérience (Etat général de l'animal avec l'observation des expressions faciales et l'état des tissus où les injections ont été réalisées). Pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins opportuns sont appliqués. Seuls les animaux traités retournent dans leur cage d'origine afin de conserver leur environnement (maison de taille adapté aux nombre de souris dans la cage, coton compressé et frisure de papier kraft, accès permanent à l'eau et à la nourriture).

Cette étude nécessite au maximum 600 souris.

7805 La maladie de Crohn (MC) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin dont la physiopathologie reste mal connue. Elle serait multifactorielle avec une interaction anormale entre le microbiote et le système immunitaire de l'hôte dans un contexte de prédispositions génétiques et environnementales. Des bactéries *E. coli* adhérents et invasifs (AIEC) ont été isolées de muqueuses iléales de patients atteints de MC. Ces bactéries possèdent la capacité d'adhérer et d'envahir les cellules épithéliales intestinales des patients menant au développement et au maintien de l'inflammation intestinale. Il a été mis en évidence que les bactéries AIEC utilisent le récepteur CEACAM6, anormalement exprimé chez les patients atteints de MC, pour adhérer à l'épithélium. Nous avons montré que l'expression du gène CEACAM6 était régulée par un mécanisme dépendant de la méthylation de l'ADN. Un apport alimentaire enrichi en molécules donneuses de méthyles pourrait influencer la méthylation du génome des cellules épithéliales et par conséquent modifier l'expression des gènes, dont le gène CEACAM6. Il a d'ailleurs été observé chez les patients des carences en molécules donneuses de groupements méthyles tel que le folate et la vitamine B12.

L'objectif principal du projet proposé est de mettre en évidence si une supplémentation en molécules donneuses de groupements méthyles pourrait apporter un bénéfice aux patients atteints de MC, de par leur effet sur la méthylation du génome des cellules intestinales. La méthylation de l'ADN induite par le régime alimentaire pourrait moduler l'expression des gènes (dont le gène CEACAM6) et limiter la sensibilité des animaux à une infection par les bactéries AIEC. Des objectifs secondaires seront également proposés tels que l'analyse de la composition du microbiote intestinale et l'étude de la perméabilité intestinale.

Pour tester ces hypothèses, un modèle murin transgénique, exprimant le gène CEACAM6 humain (CEABAC10) sera utilisé. L'utilisation de souris est nécessaire pour répondre à la problématique du projet. Ce modèle permet de mimer au mieux la physiologie intestinale des patients atteints de cette maladie. Des souris femelles sauvages (WT) recevront une nourriture enrichie en molécules donneuses de groupements méthyles (HMD : high methyl-diet) ou un régime conventionnel (Conv), 2 semaines avant la mise en présence d'un mâle CEABAC10 pour reproduction. L'ensemble du projet nécessite la mise en reproduction de 10 femelles recevant un régime conventionnel et 10 femelles recevant un régime HMD. Les analyses seront réalisées sur la descendance. Ces croisements permettront d'obtenir 15 mâles CEABAC10, 15 mâles WT recevant un régime conventionnel et 15 mâles CEABAC10, 15 mâles WT recevant un régime conventionnel.

Le nombre d'animaux utilisés pour cette manipulation a été réduit au minimum (60 animaux au total) dans la mesure où cela ne compromet pas les objectifs du projet. Dans le cadre de la règle des 3R, un maximum de prélèvements sera réalisé sur les animaux utilisés et le nombre de 60 animaux a été déterminé pour assurer des résultats statistiquement significatifs. Les animaux seront élevés dans des cages de 900 cm² (8 animaux par cages). Si des signes de douleur sont observés, l'animal concerné sera isolé et du paracétamol (200mg/kg) lui sera administré par gavage 2 fois par jours. Ces animaux seront sortis du schéma expérimental. Dans le cas où une perte de poids importante serait observée, les animaux seront euthanasiés lorsqu'ils atteindront 80% de leur poids initial. Enfin, les animaux seront euthanasiés s'ils présentent une attitude inhabituelle traduisant un mal-être ou bien du sang dans les fèces pendant plus d'une semaine.

Les animaux seront hébergés 8 par cages de 900cm² et auront libre accès à l'eau et la nourriture. Les conditions d'hébergement sont les suivantes : température 20-24°C, hygrométrie 50 plus ou moins 10%, cycle 12h/12h, éclairage 350/450 lux. Des pesées régulières sont prévues. Les animaux seront observés quotidiennement pour repérer des signes de stress ou de douleur.

Aucun enrichissement du milieu n'est prévu pour éviter toute interférence avec la manipulation

Différentes analyses seront réalisées sur les animaux des différents groupes (génotype, régime alimentaire) :

- Analyse de la perméabilité intestinale
- Analyse du microbiote intestinal
- Mesure de la capacité des bactéries AIEC à coloniser la muqueuse intestinale et à induire de l'inflammation.

Après le euthanasie, un maximum de prélèvements seront réalisés de façon à optimiser au mieux l'utilisation de ces animaux.

7806 De brèves séquences d'ischémie-reperfusion imposées par le gonflage répété d'un brassard à tension au niveau d'un membre peut induire une résistance contre les lésions provoquées par une ischémie-reperfusion au niveau d'un organe situé à distance. Alors que les mécanismes précis de conditionnement ischémique à distance sont inconnus, nous avons identifié la voie de la kynurénine et plus particulièrement la kynurénine comme l'un des médiateurs impliqués (brevet déposé). Cette voie aboutit à la formation de deux métabolites importants : l'acide quinolinique (réaction catalysée par l'enzyme KMO) et l'acide kynurénique (réaction catalysée par l'enzyme KAT). Ce projet a pour objectifs 1) d'étudier *in vivo* les potentiels effets cardioprotecteurs de la voie de la kynurénine dans un modèle d'ischémie-reperfusion myocardique chez la souris c57BL6 en évaluant la dose efficace de la kynurénine et en déterminant le métabolite responsable de la cardioprotection à l'aide d'inhibiteurs des enzymes de la voie de la kynurénine; 2) d'examiner *in vitro* l'effet protecteur de la kynurénine et de ses métabolites sur la viabilité cellulaire après hypoxie-réoxygénation dans un modèle de cardiomyocytes isolés de cœur de souris; et 3) d'analyser *in vitro* l'influence de la kynurénine et de ses métabolites sur la respiration des mitochondries et la dynamique mitochondriale dans les cardiomyocytes isolés. Enfin, nous étudierons les voies de signalisation activées dans le cœur après ischémie reperfusion myocardique avec ou sans kynurénine (par western blot) comme les voies de survie qui sont activés très tôt et d'autres voies activées plus tard comme la voie des sirtuines. Tous les animaux bénéficieront d'une analgésie et d'une anesthésie au cours des procédures chirurgicales, ainsi que d'une analgésie dans les suites opératoires. Cette étude sera réalisée chez la souris qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. 474 souris au total seront utilisées pour ce projet. Conformément à la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux (Réduire). Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. La souffrance de l'animal sera réduite au maximum ou supprimée par l'utilisation d'anesthésique (pentobarbital sodique 80mg/Kg) et d'analgésique (buprénorphine 0.1mg/Kg) aux doses appropriées (Raffiner). De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu (Remplacer).

7807 La tuberculose (TB) est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne de la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb). Notre équipe travaille activement à la recherche d'un vaccin plus efficace que le vaccin actuel, le BCG. Nos travaux précédents ont permis de proposer l'utilisation d'une souche inactivée de *Mycobacterium tuberculosis* comme alternative au BCG. Cette souche vaccinale s'est révélée immunogène et sûre dans plusieurs modèles animaux dont la souris C57BL/6. Des collaborateurs ont montré que le modèle C3H/HeNRj est plus adapté pour la mise en évidence de l'efficacité protectrice de souches vaccinales atténuées de *Mycobacterium tuberculosis*. Le présent projet vise donc à évaluer la capacité protectrice du nouveau vaccin chez la souris C3HeB/HeNRj en comparaison au BCG.

Dans l'ensemble de ces études, les animaux infectés seront utilisés pour déterminer des paramètres de sensibilité à l'infection (charges bactériennes), immunologiques (ARN, cytométrie et ELISA) ainsi que des paramètres pathologiques (analyse histopathologique des tissus). Le nombre d'animaux utilisés sera de 522 souris C3HeB/HeNRj. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 2 étapes dans notre raisonnement. Tout d'abord, nous avons développé des approches expérimentales permettant d'analyser sur un même lot d'animaux, des paramètres qui étaient avant mesurés sur des lots d'animaux séparés (exemple : préparation d'ARN, cytométrie de flux et charges bactériennes peuvent maintenant être réalisées sur le même échantillon). Ensuite, l'expérience des années précédentes nous a fourni des indications sur la taille des lots d'animaux à respecter pour obtenir en première intention des résultats statistiquement significatifs.

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à trois niveaux dans nos expériences : i) lors de la vaccination sous-cutanée; ii) lors de l'instillation intranasale de *Mycobacterium tuberculosis* et iii) lors du développement de la tuberculose. Les instillations intranasales et injections sous-cutanée, non douloureuses, seront réalisées sous simple anesthésie (Ketamine/Xylazine). Une surveillance journalière du stress et de la douleur au cours et suite à ces injections ainsi que lors de l'induction de la tuberculose expérimentale sera réalisée. Les points limites précoces choisis sont les changements dans l'aspect physique (attitude prostrée, poil terne), le comportement des animaux (isolement, déplacements limités) et une perte de poids (>15%).

7808 En poulet, le règlement 1099/2009/CE sur la protection des animaux au moment de leur mise à mort impose des paramètres électriques minimaux. Cependant ces paramètres électriques peuvent induire la mort de l'animal avant la saignée ce qui peut avoir comme conséquence une mauvaise saignée de l'animal et donc des problèmes de qualité de carcasse. Par ailleurs, les établissements pratiquant l'abattage religieux peuvent déroger à l'obligation d'étourdissement préalable à la mise à mort (arrêté du 28 décembre 2011).

Par ailleurs, l'efficacité de l'étourdissement et la qualité des produits sont influencées par d'autres facteurs que les simples variables électriques (tension, intensité, fréquence...) que sont la dimension du bain d'eau, la qualité de l'eau du bain d'électronarcose, la conception de la chaîne d'abattage, l'impédance des animaux variant en fonction du poids, du sexe, de sa composition corporelle et de sa conformation, de la qualité de la saignée et aussi vraisemblablement du temps d'application du courant passant à travers les poulets.

L'objectif de notre étude est de rechercher les paramètres électriques optimaux permettant le meilleur compromis entre la protection animale à l'abattoir et l'application du cahier des charges dans le cadre d'abattages rituels, tout en ayant une bonne qualité des produits finaux. Les paramètres électriques seront optimisés en tenant compte d'autres facteurs (temps d'application des paramètres électriques, sexe, poids et engraissement des animaux). Pour ce faire, 3 tests seront réalisés en station expérimentale.

Par ailleurs, la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner) sera respectée :

Remplacer : Il n'est pas possible de remplacer le poulet par une autre espèce ou par des mesures *in vitro* car chaque espèce aura une réponse différente face au procédé d'électronarcose et que l'objectif de l'étude est de connaître les lois de réponses sur l'espèce poulet et que chaque espèce répondra différemment à l'étourdissement électrique.

Réduire : Les effectifs de notre essai sont de 1296 animaux. Ces effectifs ont été réduits au maximum et ont été calculés afin d'être en mesure de mettre en évidence statistiquement des différences jugées biologiquement significatives notamment sur l'inconscience des animaux.

Raffiner : Au cours de l'expérimentation, l'inconscience des volailles sera vérifiée en continu, et un traitement non satisfaisant en termes d'étourdissement, sera interrompu pour éviter une souffrance inutile aux animaux.

7809 Les recherches développées ont pour but d'étudier les mécanismes d'adaptation à un stress nutritionnel chez les mammifères. Au cours de la dernière décade, nous avons démontré, dans des cellules en culture, le rôle clé joué par la voie eIF2 α /ATF4 dans le processus d'adaptation à une carence en acides aminés. Par la suite, nous avons validé la fonctionnalité de cette voie chez la souris en réponse à la consommation d'un repas carencé en un acide aminé indispensable. Afin de pouvoir étudier le rôle joué par cette voie de signalisation au niveau de l'animal entier, nous avons entrepris de générer une lignée de souris transgénique qui exprime le gène rapporteur luciférase sous le contrôle de séquences de fixation (AARE) et du facteur de transcription ATF4.

Pour chaque année, un stock de 100 de souris transgéniques homozygotes fonctionnelles (mâles ou femelles) sera constitué à partir d'environ 150 souris ce qui correspond à 500 souris sur 5 ans. Les souris transgéniques non fonctionnelles pour l'induction du transgène seront euthanasiées. Les souris sélectionnées serviront à (1) la reproduction et (2) à des expériences nutritionnelles.

Ce projet sera réalisé selon la réglementation 2010/63/UE et selon la règle des 3rs (Réduction, remplacement, raffinement). Le nombre d'animaux utilisés pour chaque expérience est calculé au minimum en fonction du test statistique retenu (Réduction). Pour chaque expérience nutritionnelle, des points limites (perte de poids, consommation,..) seront définis et des groupes "contrôle" adaptés au protocole seront constitués avec un nombre d'animaux suffisant statistiquement (Raffinement). Ces expériences nutritionnelles vont permettre de valider des résultats obtenus *in vitro* et sont nécessaires pour évaluer l'impact des différents régimes testés sur l'organisme entier (Remplacement).

7810 L'apparition d'une insuffisance cardiaque (IC) chronique chez les patients dialysés a été décrite. En revanche, l'apparition d'une dysfonction cardiaque rapide lors de la survenue d'une défaillance rénale aiguë définie comme Syndrome Cardio-Rénale de type 3 (SCR-3) n'a été que peu étudiée et les mécanismes mis en jeu sont mal connus.

Des résultats récents ont mis en exergue 3 protéines (Galectine 3, BNP : Brain Natriuretic Peptide ; et QSOX1), bien connues comme biomarqueurs d'insuffisance ou de remodelage cardiaque en clinique mais dont les fonctions lors de l'insuffisance cardiaque aiguë (ICA) directe ou induite par un épisode d'agression rénale aiguë (ARA) sont encore méconnues. Une de nos hypothèses est que la Galectine-3 (Gal-3) pourrait être impliquée dans la physiopathologie des atteintes cardio-rénales. Cette protéine de 32 à 35 kDa est exprimée dans de nombreux tissus, dont le cœur et le rein. Elle est localisée aux niveaux intra- et extracellulaires. Au niveau intracellulaire la Gal-3 est présente principalement dans le cytoplasme et le noyau. Elle est sécrétée par différents types cellulaires : cellules épithéliales, endothéliales, cellules de l'inflammation dont les macrophages. Au niveau cardiaque, les macrophages sont la source principale de Gal-3. Cette protéine a été montrée à plusieurs reprises comme étant impliquée dans la fibrose cardiaque ou rénale.

Les objectifs du projet sont de déterminer :

- 1- le phénotype cardiaque (fonction cardiaque normale ou pas) et l'observation de l'augmentation de marqueurs d'agression cardiaque,
- 2- le(s) rôle(s) de Galectine 3 (Gal-3) dans le développement de l'ICA,
- 3- les relations entre les lésions rénales et la fonction cardiaque (au niveau systémique).

Les différents axes du projet impliquent 260 souris, dont des souris transgéniques, pour l'ensemble des protocoles expérimentaux pour une période de 5 ans. Les groupes de comparaisons ont été conçus de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Un soin particulier sera apporté

au raffinement des traitements contre la douleur avant, pendant et après les procédures expérimentales.

Dans cette étude, nous utiliserons :

1) un modèle d'occlusion unilatérale de l'uretère dans le but d'induire une agression rénale sans dysfonction par la compensation de l'autre rein. Cette opération consiste en une ligature définitive de l'uretère gauche. L'occlusion va entraîner au 7^{ème} jour des dommages tubulaires sans dysfonction rénale grâce au rein controlatéral. Sur le long terme le rein controlatéral va s'hypertrophier pour compenser le rein gauche qui sera totalement inefficace.

2) des explorations physiologiques (échocardiographie, mesure de pression artérielle).

Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cœur, rein, foie, poumons, cerveau, aorte, et muscle squelettique) sont prélevés, stockés et dédiés aux analyses moléculaires, biochimiques et histologiques. Le suivi longitudinal (par échocardiographie, mesure de pression, empêchant la mise à mort des souris pour obtenir des résultats à différents temps avant le temps de mise à mort) et le prélèvement de tous les organes, permet une réduction significative du nombre d'animaux.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permet de rendre compte de façon fiable, ces interactions présentes au sein d'un tissu tel que le myocarde et des échanges entre cellules, tissus et organes.

Si les effets bénéfiques de la modulation de Gal-3 dans l'insuffisance cardiaque aiguë, secondaire à une ARA, sont confirmés, nous pourrions envisager de définir des cibles d'intérêt thérapeutiques afin de diminuer leur morbi-mortalité.

7811 Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps poly clonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunomécanique. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une alternance entre des immunisations classiques associant un antigène (protéine/ cellule/ peptide) à un adjuvant et des immunisations géniques, décrites pour la première fois en 1992, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. L'immunisation génique consiste à injecter chez l'animal directement dans un muscle ou dans la peau, un ADN codant une protéine cible, laquelle va s'exprimer *in situ* comme immunogène et déclencher rapidement une réaction immunitaire.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire. Les lymphocytes B, isolés à partir de la rate des poules immunisées, seront triés et séquencés afin de générer *in vitro* des anticorps monoclonaux recombinants. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre des structures protéiques particulières, une quantité de 20 poules sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention de lymphocytes B produisant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La poule est notamment utile pour la production d'anticorps contre des protéines de mammifères, car elle est éloignée phylogénétiquement de la classe des Mammalia. De manière générale, les poules sont d'excellentes productrices d'anticorps et leur réponse immunologique est comparable à celle des mammifères.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 poules (2 x10).

Le temps minimum d'immunisation est de 99 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. Un certificat d'innocuité est fourni par le client stipulant que l'antigène n'est pas toxique et ne présente pas de risque pour les utilisateurs ainsi que pour la santé des animaux. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité modérée pour les immunisations classiques (antigène associé à un adjuvant) et légère pour les immunisations géniques (anesthésie + absence d'adjuvant). Les immunisations géniques seront réalisées, après anesthésie, via une injection intramusculaire au niveau du muscle tibial antérieur conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le weekend) et plus particulièrement durant les premières heures suivant l'immunisation.

Les poules sont hébergées dans des installations appropriées et elles disposent d'enrichissement (grattoir, coquille d'huitre, pommes).

7812 Les infections bactériennes pulmonaires sont responsables de nombreuses pathologies associées à une mortalité majeure. C'est le cas de la tuberculose (TB) qui est l'une des trois pathologies infectieuses à agent étiologique unique les plus meurtrières. Elle est causée par l'infection par voie aérienne par la bactérie *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) responsable de manifestations essentiellement pulmonaires. On retrouve également des pathologies nosocomiales auxquelles sont associées de nombreux pathogènes dont *Pseudomona aeruginosa* ou *Klebsiella pneumoniae* et enfin la mucoviscidose dans laquelle on retrouve également l'implication de mycobactéries comme *Mycobacterium abscessus* ou encore *Pseudomonas aeruginosa*. Finalement, nous avons également un intérêt pour *Francisella novicida*, pathogène également pulmonaire et modèle d'agent de bioterrorisme. Parmi les axes principaux de recherche dans ces pathologies figurent la recherche de cibles thérapeutiques (sur l'hôte ou la bactérie elle-même) ainsi que la recherche d'un vaccin ou d'un nouveau vaccin plus efficace que le vaccin actuel (exemple du BCG pour TB).

La spécificité de notre projet est qu'il s'intéresse au rôle du microbiote dans ces infections. Le microbiote participe par compétition à la lutte contre la colonisation de bactéries pathogènes et à la modification du métabolisme des cellules immunitaires (telles que les macrophages) soit présentes à proximité soit dans d'autres organes (tels que l'intestin) via la sécrétion de métabolites qui peuvent diffuser dans le sang. Si le rôle du microbiote est déjà décrit dans plusieurs pathologies, très peu d'études existent aujourd'hui sur son rôle dans la réponse aux infections pulmonaires. L'hypothèse de notre projet est que le microbiote, par le biais de réseaux métaboliques, module la réponse immunitaire pulmonaire et, par conséquent, module la réponse antimicrobienne et/ou les mécanismes de tolérance de l'hôte. Disposant des résultats marquants obtenus dans un projet précédent dans

l'infection de la souris C57BL/6 par *M. tuberculosis*, nous souhaitons comprendre si l'importance du microbiote varie en fonction de la sensibilité de la souche de souris et quel est son importance dans l'immunité pulmonaire contre des bactéries autres que *M. tuberculosis*.

Le nombre maximal d'animaux utilisé sera de 15552 souris se répartissant en souris de sensibilité différentielle à la tuberculose et possédant des réponses immunitaires qualitativement différentes, ce qui nous permettra d'associer ces réponses à la sensibilité des animaux. Afin de s'inscrire dans la logique des 3R, nous avons intégré 4 étapes dans notre raisonnement.

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

Ensuite, certaines étapes de nos projets (clairement identifiées dans les procédures détaillées) pourront en effet être suivies de décisions de poursuite ou d'arrêt de l'étude en fonction des promesses offertes par les résultats.

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

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

La souffrance et/ou le stress animal sont présents à deux niveaux dans nos expériences : i) lors de l'inflammation pulmonaire chronique induite par l'infection et ii) lors de l'administration de souches bactériennes commensales. Ces deux niveaux de douleurs font l'objet d'une prise en charge spécifique indiquée dans les procédures respectives et déjà appliquées dans nos projets antérieurs. Tous les animaux sont hébergés selon les normes d'éthique en vigueur et disposent d'enrichissement lors de la stabulation.

7813 Le système lymphatique est constitué d'un ensemble de vaisseaux qui drainent les excès de liquide au niveau des tissus vers les organes lymphoïdes comme les ganglions lymphatiques et la rate qui sont les sites de l'élaboration de la réponse immunitaire. Il contribue à la circulation des cellules immunitaires dans tout le corps.

La lymphe provient d'une filtration d'une partie des éléments du sang et sert à activer le système immunitaire lors d'une infection. La lymphe traverse des ganglions lymphatiques qui sont à la fois des filtres et des barrières immunitaires s'opposant à la progression d'éléments pathogènes.

Dans le cas de cancer, la prolifération tumorale est associée à un accroissement des réseaux vasculaires et lymphatiques à proximité de la tumeur favorisant ainsi les échanges biologiques, assurés par le sang et la lymphe, nécessaires à la croissance tumorale.

Des cellules cancéreuses peuvent alors infiltrer les vaisseaux lymphatiques et traverser les ganglions lymphatiques. Elles y sont généralement séquestrées et détruites mais il arrive parfois qu'elles y forment un foyer tumoral secondaire avant de poursuivre leur propagation vers d'autres organes. C'est souvent le cas dans le cancer du sein où le ganglion sous-axillaire est le premier relais métastatique.

Le système lymphatique constitue un élément essentiel du système immunitaire mais aussi une voie majeure de dissémination des cellules métastatiques. Son rôle est donc important et il peut être une cible pour les thérapies géniques anti-cancéreuses. De la même manière que les cellules cancéreuses, les vecteurs transportant l'ADN pourraient entrer dans les vaisseaux lymphatiques et cibler les ganglions pour y délivrer leur gène médicament.

Cette étude est une étude préliminaire *in vivo* ayant pour objectif de démontrer la faisabilité de cette hypothèse et de montrer que la voie intradermique permettrait de cibler plus particulièrement les vaisseaux lymphatiques et les cellules des ganglions lymphatiques. Notre hypothèse est que, en raison de leur taille, ces vecteurs transportant le gène, pourraient être absorbés par le système

lymphatique et retenus dans les ganglions lymphatiques, étant trop grosses pour entrer dans les capillaires sanguins.

Cette étude porte sur des systèmes non viraux de transport de gène (vecteur chimique lié à l'ADN sous forme de nanoparticules) qui ont déjà démontré un fort potentiel en thérapie génique ou en transfert de gène dans des cellules *in vitro*.

Dans un premier temps, nous étudierons la bio distribution de ces nanoparticules chez un animal sain afin de vérifier qu'elles sont bien distribuées dans les ganglions proches du site d'injection

Dans un deuxième temps, nous testerons la capacité de transport et transfert de gène de ces systèmes sur un modèle murin de cancer métastatique du sein qui est représentatif de l'environnement tumoral d'un cancer humain invasif. Nous chercherons à savoir si ces systèmes sont efficaces *in vivo* et si oui quels types de cellules sont transfectées : les cellules du système immunitaires, les cellules cancéreuses ou les deux.

Cette étude est donc une preuve de concept. Son objectif est d'étudier, *in vivo*, la capacité de ces systèmes de transport de gène à cibler les vaisseaux et ganglions lymphatiques après injection intradermique et à y délivrer le gène médicament. Cette technique ouvrirait de nouvelles perspectives pour la thérapie génique dans des domaines tels que l'immunothérapie en ciblant soit les dernières cellules cancéreuses cachées dans les ganglions qui auraient échappées aux autres traitements soit en stimulant les défenses immunitaires contre les cellules cancéreuses.

En dépit de l'effort constant de développer des méthodes alternatives pour limiter l'utilisation d'expériences animales, il y a des questions, notamment en ce qui concerne la bio distribution des vecteurs de médicaments et l'efficacité de la transfection dans des conditions pathologiques spécifiques, auxquelles on ne peut répondre qu'avec des études sur des organismes entiers.

Ce n'est que dans une étude sur les animaux qu'il sera possible d'évaluer l'interaction des nanoparticules avec les composants de la matrice extracellulaire et leur passage du milieu interstitiel aux vaisseaux et aux organes.

Les modèles tumoraux chez les animaux permettent de reconstruire la complexité de la tumeur, en particulier l'infiltration cellulaire et la vascularisation, qui ne sont pas encore modélisables *in vitro*.

Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans ce projet, des études ont été menées en amont sur des cultures cellulaires pour évaluer l'efficacité de transfection des nanoparticules sur les cellules cancéreuses et les cellules immunitaires. Seules les formulations optimales sélectionnées *in vitro* seront utilisées dans des études *in vivo*, ce qui permettra une réduction des animaux requis. Le nombre d'animaux / groupe a été réduit au minimum grâce à une planification minutieuse qui permettra une interprétation statistique de nos résultats. Les animaux seront anesthésiés pour éliminer la sensation de douleur lors des procédures invasives. Afin de réduire au minimum la douleur, des points limites appropriés, suffisamment précoce et prédictif seront déterminés. Pour mener à bien cette étude, nous prévoyons utiliser un total de 279 souris.

7814 La témocilline est une bêta-lactamine active sur la plupart des bactéries responsables d'infections urinaires, y compris les entérobactéries productrices de b-lactamase à spectre élargi (EBLSE). Elle n'est en revanche pas active vis-à-vis des bactéries anaérobies commensales du tube digestif.

L'hypothèse sous-tendant ce projet est que le spectre original de la témocilline pourrait lui conférer une faible capacité à sélectionner les EBLSE au sein du microbiote intestinal des patients exposés. L'objectif de ce travail sera donc de comparer dans un modèle de colonisation digestive chez la souris, les effets sur l'écologie microbienne et sur l'émergence des EBLSE, d'un traitement par témocilline à ceux d'un traitement par d'autres antibiotiques utilisés dans les infections urinaires : ceftriaxone (céphalosporine de 3^{ème} génération injectable), par ciprofloxacine (fluoro-quinolone) et par le cotrimoxazole (association de triméthoprime et de sulfaméthoxazole).

Nous utiliserons un modèle de colonisation à *Escherichia coli* BLSE chez la souris mis au point dans notre laboratoire pour la colonisation par des entérobactéries productrices de carbapénémase. Dans ce modèle, de fortes quantités d'*E. coli* BLSE (10⁹ UFC/mL) sont administrées par gavage immédiatement après que la flore digestive commensale des souris n'ait été profondément remaniée par une administration de vancomycine, ceftriaxone et métronidazole pendant 5 jours. Une mise au

point sur le modèle sera nécessaire afin de travailler sur des souris les plus faiblement colonisées possible (limite de sensibilité de la détection de la colonisation) afin de mieux montrer l'émergence des E. coli BLSE. Pour cette mise au point, il est prévu une étude de la cinétique de décroissance de la colonisation digestive par E. coli BLSE, afin de déterminer les paramètres de distribution (médiane, P25, P75) du délai nécessaire au passage du niveau de colonisation par E. coli BLSE sous le seuil de détection. Ceci devrait permettre de choisir le délai entre l'inoculation de la souche d'E. coli BLSE et la mise en œuvre de l'administration des antibiotiques.

La témocilline, la ceftriaxone (une céphalosporine de 3ème génération communément utilisée pour le traitement des infections urinaires), la ciprofloxacine ou le cotrimoxazole seront administrée en monothérapie aux souris colonisées ainsi qu'à des témoins non colonisés pendant 5 jours. La posologie des antibiotiques sera adaptée pour reproduire la pharmacocinétique observée chez l'homme dans le sang et les fèces.

L'utilisation des animaux est justifiée car il n'y a pas de méthode *ex vivo* alternative permettant d'obtenir le niveau de complexité d'une flore intestinale.

195 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

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

-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). Les animaux sont placés dans des cages contrôlées en température et hygrométrie (cycle de lumière 12h/12h) avec enrichissement afin de favoriser leur bien-être

7815 Nous avons montré le potentiel des LTregs CD8+CD45RClow en thérapie cellulaire en transplantation d'organe solide, dans un modèle de greffe de peau humaine chez la souris NSG. Nous avons aussi montré que les LTregs CD8+ sont capables de contrôler réponse immune xénogénique des PBMCs humaines contre la souris. L'objectif est maintenant d'évaluer le potentiel des LTregs CD8+ dans le contrôle de la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD = graft versus host disease) lors d'une greffe de moelle osseuse.

Un article publié en 2013, montre un modèle de GVHD allogénique dans lequel les souris NSG sont injectées avec les PBMCs d'un premier donneur humain, puis 1 mois plus tard, injectées avec les PBMCs d'un second donneur humain. La réaction des cellules des 2 donneurs humains chez la souris se caractérise par une perte de poids en <10 jours, dite GVHD aigue. L'objectif est d'utiliser ce modèle afin d'évaluer si la co-injection de LTregs CD8+ permet de protéger la souris de la GVHD aigue. Ce modèle permettra aussi d'évaluer si la spécificité contre le donneur conféré aux LTregs leur apporte un avantage significatif sur le contrôle de la GVD allogénique.

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

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

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

-Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids initial seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les animaux seront suivis pour leur poids,

le développement de la GVH et/ou du rejet de greffe et des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Tous les animaux traités avec les cellules régulatrices et ceux des groupes contrôles seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'information post mortem, au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH, et par immunohistologie pour étudier la migration des cellules injectées et leurs mécanismes d'action.

Les résultats obtenus permettront de déterminer le potentiel thérapeutique des Tregs CD8+CD45RClow sur les réponses immunes intervenant dans des contextes d'allogreffe de moelle osseuse, aideront à déterminer le nombre de cellules à administrer chez un patient pour le traiter, et permettront de mieux comprendre leurs mécanismes d'action par les analyses anatomopathologiques des organes des souris traitées. Cette étude est soutenue par 2 brevets quant au potentiel thérapeutique clinique prometteur des Tregs CD8+CD45RClow dans le domaine de la transplantation d'organe solide et de cellules, mais aussi pour le traitement de maladies auto-immunes. La validation de ces cellules dans ce modèle préclinique de souris humanisée est une étape indispensable avant les tests cliniques.

7816 Ce projet d'étude de la biodistribution de nanoparticules après administration sous-cutanée chez la souris s'inscrit dans un axe de recherche sur la conception de nanoparticules à visée théranostique. Le mot théranostique, contraction de thérapie et diagnostic, désigne le développement de nanoparticules permettant à la fois l'imagerie médicale pour le diagnostic et la libération d'un principe actif dans l'organisme. Ces systèmes ont pour but d'améliorer l'efficacité de substances actives antivirales et anticancéreuses tout en permettant un suivi de leur devenir par imagerie médicale à des visées de diagnostic et de suivi du traitement. L'originalité des systèmes développés tient à l'utilisation de nanoparticules permettant à la fois (i) d'optimiser l'encapsulation et la libération de substances actives et (ii) des propriétés de détection en IRM (imagerie par résonance magnétique). L'utilisation de la voie d'administration sous-cutanée permettrait le ciblage des ganglions lymphatiques, ce qui est particulièrement intéressant pour le ciblage des réservoirs viraux dans le cas des traitements antirétroviraux, et pour l'identification et le traitement des processus métastatiques dans le cas du cancer.

Les travaux déjà engagés depuis plusieurs années ont abouti à la formulation de nanoparticules optimisées en termes d'encapsulation et de modulation de la libération de substances actives antivirales et anticancéreuses, d'association à des implants injectables à libération prolongée, ainsi que pour l'utilisation comme agent de contraste en IRM. Ces systèmes ont également été évalués *in vitro* sur des cultures cellulaires afin d'en évaluer la cytotoxicité, la capture cellulaire, l'aptitude à la délivrance de substances actives ainsi que les propriétés d'agent de contraste après capture, validant ainsi les hypothèses de départ.

Nous envisageons maintenant d'évaluer ces formulations *in vivo* chez la souris afin d'évaluer à l'échelle de l'organisme vivant les propriétés suivantes : (i) la capacité des implants injectables à libérer progressivement les nanoparticules dans la circulation lymphatique après administration sous-cutanée, et (ii) la capacité des nanoparticules à s'accumuler au niveau ganglionnaire. Pour cela, des souris recevront des formulations sélectionnées par injection dans le mollet de la patte postérieure. Leur suivi sera effectué par des mesures de fluorescence *in vivo*, grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes dans les nanoparticules. Il sera confirmé par l'utilisation d'une substance active radiomarquée chargée dans les nanoparticules afin de quantifier son accumulation ganglionnaire.

Les procédures expérimentales décrites dans cette demande s'efforcent de respecter les règles des 3R :

- Remplacement : les essais menés *in vitro* sur des cultures cellulaires ont permis une première évaluation biologique au niveau cellulaire en termes de toxicité et d'efficacité de ciblage de substance active et d'agent de contraste, et de sélectionner les formulations les plus prometteuses. Les expériences *in vivo* sont ainsi menées sur un nombre limité de candidats, et restreintes à l'évaluation de propriétés qui ne peuvent l'être qu'à l'échelle de l'organisme entier : le ciblage tissulaire et la libération prolongée dans la circulation lymphatique.

- Raffinement et réduction du nombre d'animaux par l'utilisation principalement de l'imagerie par fluorescence *in vivo*, permettant un suivi dans le temps d'un même animal ; réduction de la douleur

par l'utilisation d'une technique d'injection sous-cutanée alternative à l'injection dans le coussinet de la patte, et par l'utilisation principale d'une technique d'imagerie non invasive. 388 souris sont prévues pour ce projet.

En cas de succès, cette étude permettra d'envisager une évaluation préclinique de ces systèmes nanothéranostiques à visée antivirale et anticancéreuse à l'aide de modèles pathologiques.

7817 Le porc est une des premières sources mondiales de produits carnés mais il est également un excellent modèle, complémentaire aux rongeurs, pour de nombreuses pathologies humaines comme le diabète, les maladies cardio-vasculaire, certaines scléroses et myopathies ou des études en toxicologie. Il est donc important de continuer à utiliser ce modèle tout en prenant en compte les enjeux sociaux-économiques actuels, concernant notamment la réduction du recours aux animaux pour l'expérimentation biomédicale, toxicologique ou agronomique. Pour cela, le développement de lignées de cellules souches pluripotentes dans l'espèce porcine est un outil stratégique. Les cellules souches pluripotentes sont en effet des cellules en auto-renouvellement capables de se différencier dans les différents types cellulaires constituant un organisme. Il est également facile de manipuler leur génome et de reproduire ainsi des mutations à l'origine de pathologies dans l'espèce humaine. Ces technologies permettent aussi de mieux comprendre le fonctionnement du génome porcine, en lien avec des caractères agronomiques, comme la résistance aux pathogènes ou l'efficacité alimentaire et ce, sans recourir aux animaux.

Cependant, si la culture des cellules souches pluripotentes humaines et murines est maintenant bien maîtrisée, il est toujours impossible de dériver de telles lignées cellulaires dans de nombreuses espèces d'élevage, comme le porc ou les bovins. Afin de comprendre les barrières qui bloquent l'obtention de telles cellules, nous avons besoin de comprendre comment ces cellules souches pluripotentes apparaissent et se régulent dans l'embryon précoce. C'est la raison pour laquelle nous souhaitons réaliser une analyse transcriptomique sur des blastocystes porcins.

Notre projet intègre la règle des 3Rs : (1) remplacer, (2) réduire, (3) raffiner.

En effet nous avons besoin de recourir aux animaux pour comprendre la biologie des cellules embryonnaires mais ces données serviront ensuite à définir les conditions nécessaires et optimales pour la production de lignées pluripotentes et ce afin de (1) remplacer le recours à l'animal par des modèles cellulaires efficaces.

D'autre part, afin de (2) réduire le nombre d'animaux nécessaire à cette expérimentation, nous allons utiliser des systèmes moléculaires innovants permettant d'amplifier tous les transcrits à partir de très faible quantité de cellules. Une analyse statistique a été également utilisée afin d'estimer le nombre minimum d'animaux nécessaires à l'obtention de résultats significatifs. Il s'agit ici de 19 femelles donneuses.

Afin de (3) raffiner l'expérimentation et de réduire au maximum la souffrance de l'animal, des antalgiques seront systématiquement initiés en post opératoire. L'état général, l'apparence et le comportement de l'animal, révélateurs du niveau de douleurs, serviront à adapter secondairement la dose administrée. Enfin, afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, leur environnement sera enrichi (activité de foin encouragée par litière paillée).

7818 D'après l'Organisation Mondiale de la Santé, le cancer est une cause majeure de décès dans le monde à l'origine de 8.2 millions de décès en 2012. A l'heure actuelle de nombreux traitements ont été développés tels que la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie, l'immunothérapie ou la chirurgie. Certains de ces traitements sont très difficiles à supporter pour le patient (chirurgie mutilante, chimiothérapie lourde).

Des progrès thérapeutiques doivent encore être réalisés afin de découvrir de nouvelles molécules anti-cancéreuses ou de permettre d'optimiser l'utilisation de molécules ou techniques déjà existantes.

Ce projet comporte plusieurs objectifs :

- Caractériser des modèles murins tumoraux en évaluant le développement de différentes lignées cellulaires tumorales injectées chez la souris.

- Evaluer l'efficacité de différents produits anti-cancéreux sur des modèles murins tumoraux déjà développés ou développés au cours de ce projet.
- Evaluer la biodispersion et la quantification d'un produit anti-cancéreux

Le recours à l'imagerie médicale (bioluminescence, fluorescence ou scanner à rayon X) dans ce projet permet soit de suivre directement au cours du temps le développement des tumeurs et/ou de suivre l'évolution de produits anti-cancéreux dans l'organisme. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas l'euthanasie d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire.

50 études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux sera variable pour chaque étude (environ 40 par étude). Un nombre minimum de 6 animaux par groupe sera (si possible) prévu afin de pouvoir réaliser des tests statistiques sur les résultats obtenus. Un maximum de 2000 animaux sur l'ensemble du projet pourra être utilisé.

Le recours à l'expérimentation animale est nécessaire afin de pouvoir appréhender l'efficacité et/ou la biodispersion d'un produit anti-cancéreux dans un organisme entier vivant (modélisation d'une situation clinique). Actuellement, il n'existe pas de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité d'un traitement anti-cancéreux dans un organisme vivant.

L'espèce souris a été choisie car c'est un modèle standard polyvalent qui est régulièrement utilisé dans les modèles d'oncologie. De plus, l'utilisation de souris greffées avec des tumeurs humaines ou non est un modèle de référence pour l'évaluation de l'efficacité de traitements anti-cancéreux.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes pour prévenir l'apparition de ces points limites et essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mise en place d'un traitement ou mise à mort de l'animal) le plus rapidement possible.

7819 Certains composés rentrant dans la composition des emballages plastiques destinés au contact alimentaire sont capables de migrer depuis l'emballage jusque dans l'aliment. Ces composés sont donc des contaminants alimentaires dont il est important de connaître les risques liés à une exposition régulière, en particulier lors d'expositions in utero ou juste après la naissance. Le but d'une étude de métabolisme est d'identifier les différents métabolites après la biotransformation dans l'organisme du composé parent et de caractériser une potentielle toxicité des métabolites produits. En effet, certains métabolites issus de la biotransformation du composé parent se sont révélés plus toxiques et avec des effets biologiques plus nocifs que la molécule parente. Ces études de métabolisme doivent être menées dans le but de fournir aux instances réglementaires les données nécessaires pour la caractérisation du danger et l'évaluation du risque de ces composés, en intégrant les données du métabolisme. Ces études doivent être réalisées chez l'animal de laboratoire afin de disposer d'un modèle complet avec toutes les influences hormonales, nerveuses et sanguines qu'il est impossible de considérer sur des modèles cellulaires. En revanche, les études de métabolisme ne nécessitent que peu d'animaux (4 par groupe au maximum), ce qui participe à la réduction du nombre d'animaux utilisés à des fins expérimentales. Afin d'identifier les différences de métabolisation selon leur statut, cette étude sera réalisée chez 16 rats Wistar, répartis en 4 groupes de 4 animaux (4 rats mâles, 4 rates adultes, 4 rates gestantes (en fin de gestation) et 4 rates allaitantes, ainsi que les fœtus (32) et nouveau-nés (environ 32). Cette étude fait donc appel à 80 animaux au total. La souche animale choisie est celle qui est la plus recommandée pour ce type d'étude; c'est également une des souches la plus utilisée pour les études de toxicité. Tous les organes seront prélevés, et les urines et fèces de 24h seront collectées en continu de façon à réaliser un bilan métabolique et une étude de la distribution complète de la molécule choisie et/ou de ses métabolites dans l'organisme. Le temps 24h permet de limiter au maximum la durée de séjour des animaux en cage à métabolisme. Cette étude sera également réalisée chez les fœtus des femelles gestantes et les nouveau-nés de façon à identifier un passage transplacentaire de la molécule parente et/ou de ses métabolites, et un passage dans le lait chez le nouveau-né. L'identification des métabolites majeurs sera également réalisée (méthodes analytiques et biochimiques). Tous les animaux seront surveillés quotidiennement pour s'assurer de leur bon état de santé et toutes les conditions d'hébergement seront réunies pour leur

assurer le maximum de confort pendant la durée de l'expérimentation. Une attention toute particulière sera accordée à chaque rat au moment du gavage, étape pouvant générer du stress chez l'animal, pour réaliser ce travail le plus vite et le plus délicatement possible, grâce à la longue expérience des manipulateurs, experts dans cette procédure, qui se déroulera dans une ambiance calme et apaisante pour les animaux. Des canules en polypropylène seront utilisées de façon à ne léser ni la cavité buccale ni l'œsophage des animaux, et ainsi n'induire ni douleur ni souffrance. L'ensemble de ces résultats vont contribuer à évaluer le danger lié à l'utilisation du BADGE, et seront portés à la connaissance des agences réglementaires pour aider à une bonne évaluation du risque, en particulier chez les personnes à risques (bébés et enfants).

7820 Les objectifs de ce projet sont, chez le chien adulte et en bonne santé, de

- (i) Comparer les effets de deux niveaux d'apport protéique sur la masse maigre,
- (ii) Mesurer l'effet de l'activité physique, en conjonction avec un apport protéique élevé, sur le développement de la masse maigre.

Un apport de protéines supérieur à ce qui est nécessaire à l'entretien peut stimuler la synthèse protéique au niveau du muscle et en augmenter en outre la force. Par ailleurs, l'activité physique permet d'augmenter la masse musculaire (et donc la masse maigre, ainsi que le rapport masse maigre/masse grasse). Ceci s'accompagne notamment d'une augmentation de la sensibilité à l'insuline et d'une réduction des teneurs circulantes en marqueurs de l'inflammation. De plus, le maintien sinon l'augmentation, avec l'âge, d'un rapport masse maigre/masse grasse élevé retarderait l'émergence des problèmes ostéoarticulaires et réduirait ensuite l'intensité de la douleur qu'ils peuvent provoquer.

Pour poursuivre ces objectifs, nous sommes susceptibles de mettre en œuvre les procédures suivantes qui concerneront 18 chiens :

1. Détermination de la composition corporelle par dilution d'une dose d'eau deutérée ($2\text{H}_2\text{O}$) en début et fin de protocole

La procédure consiste en deux prélèvements de sang, l'un basal, l'autre 4 heures après injection d'une dose d'eau deutérée (au maximum 500 mg/kg).

2. Détermination de la dépense énergétique par la méthode des échanges respiratoires en début et fin de protocole

La dépense énergétique est fortement corrélée à la production de dioxyde de carbone et au quotient respiratoire (CO_2 produit/ O_2 consommé) qui indique la nature des substrats oxydés.

Les animaux seront placés pendant au maximum 4 heures (détermination d'autant plus précise que la durée d'enregistrement est plus longue) dans une cage assujettie à un dispositif assurant la ventilation et la mesure de la concentration en gaz de l'air entrant (inspiré) et sortant (exhalé) de la cage.

3. Activité physique sur un tapis roulant incliné

Seul un tiers des animaux auront une activité physique encadrée 3 fois par semaine. La durée de celle-ci sera de 30 minutes, la vitesse du tapis sera adaptée pour que chaque chien aille au trot.

4. Biopsie musculaire

A la fin des douze semaines de protocole, une biopsie du biceps fémoral sera réalisée afin d'identifier le type de fibres et déterminer la taille de celles-ci.

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

Remplacer : Le chien est l'espèce cible et il n'existe pas de modèle ou moyen alternatif qui ne soit pas *in vivo*

Réduire : En considérant que la différence d'évolution du poids entre un groupe soumis à l'exercice physique et un groupe qui ne l'est pas est de l'ordre de 1,2% avec une erreur standard de 0,8, pour assurer une puissance de 80% aux tests statistiques (modèle à effets mixtes), la taille minimale de chaque échantillon a été établie à 6 chiens.

Raffiner : Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance que pourraient ressentir les animaux ainsi que tout dommage qu'ils pourraient subir.

7821 L'anguille européenne est classée en liste rouge de l'UICN, des espèces en danger critique d'extinction. La phase de dévalaison est une phase critique de son cycle biologique. De par son statut, il est primordial d'accroître nos connaissances d'autant plus qu'il subsiste encore de nombreuses lacunes dans la compréhension de certaines phases du cycle biologique de l'anguille. Aussi, ce constat est plus marqué sur le bassin Rhône Méditerranée. Sur la façade atlantique, son comportement de dévalaison (migration des géniteurs vers la mer pour accomplir leur acte de reproduction) est mieux connu que dans le bassin Rhône-Méditerranée-Corse, qui peut présenter localement des conditions hydrologiques particulières. Il est donc important de lancer des initiatives afin d'améliorer nos connaissances pour agir en faveur de la reconstitution des stocks d'anguille en accord avec les directives européennes.

Pour se faire, un maximum de 400 anguilles argentées*, sur 4 ans, seront nécessaires au suivi. Il s'agira de les prélever dans le milieu par pêche électrique. Cette technique de capture inhibe les actes volontaires du poisson (anesthésie motrice). Les poissons sont attirés vers une électrode tenue par un opérateur et sont capturés, sans aucune séquelle, à l'aide d'une épuisette.

Par la suite, une biométrie sera réalisée pour définir leur degré d'argenture (maturation). Les individus considérés comme dévalant seront marqués à l'aide de petite puce avant d'être relâchés.

Il nous sera possible de suivre leurs déplacements grâce à des antennes fixées dans le cours d'eau qui enregistreront le passage de chaque individu (technologie RFID). L'étude se déroulera sur la Cagne, fleuve propice à l'installation d'antennes grâce à sa faible largeur (10 m) et une bonne population d'anguille.

Ainsi, l'objectif du projet porte sur l'étude comportementale de l'anguille durant sa phase de dévalaison afin d'évaluer les relations complexes, entre l'animal et les conditions environnementales, régissant cette dynamique. Pour ne pas biaiser les résultats, l'expérimentation se doit d'être au plus proche des relations naturelles (poisson/milieu). De ce fait, les conditions requises pour le bon déroulement du projet ne permettent pas de s'affranchir de l'emploi des poissons.

Seules les anguilles présentant un indice d'argenture avancé feront l'objet d'un marquage pour le suivi. Au vu des conditions dans lesquelles se déroulera l'étude (milieu naturel ouvert) et pour faire face aux différentes altérations extérieures (environnement non contrôlé, interférences urbaines...) il s'avère nécessaire d'utiliser une centaine d'animaux par année garantissant l'obtention de résultats représentatifs et robustes.

Enfin, entre les phases de capture – marquage – relâché, les poissons seront stockés dans des bacs remplis avec de l'eau provenant de la rivière pour limiter les situations de stress induites par un choc thermique et/ou physico-chimique. Cette eau sera oxygénée et régulièrement remplacée pour garantir des conditions de confort optimales. Toutes les manipulations se feront sur place pour limiter le temps de travail. Celles-ci se feront sous anesthésiés et les poissons seront placés dans un environnement humide.

* Les anguilles dites « argentées » correspondent aux individus ayant subi une métamorphose préparatoire à leur migration marine de reproduction

7822 La vaccination est l'une des avancées majeures de la médecine moderne. Elle a permis de réduire grandement la prévalence de nombreuses maladies telles que la variole et le maintien d'une bonne couverture vaccinale est indispensable pour éviter la résurgence de ces maladies infectieuses.

Bien que l'utilité de la vaccination ait été amplement démontrée, une défiance croissante de la population vis-à-vis de la vaccination a émergé depuis quelques années, liée à certains événements, comme par exemple les crises sanitaires (Médiator, sang contaminé, etc.), les soupçons de collusion entre autorités de santé et industrie du médicament sous l'effet de scandales médiatisés et la question des adjuvants dans les vaccins.

L'oxyhydroxide d'aluminium (alum) est utilisé pour ses propriétés d'adjuvant vaccinal depuis 1927. Il demeure l'adjuvant le plus utilisé, mais les mécanismes par lesquels il stimule la réponse immunitaire sont encore largement incompris. Généralement bien toléré, l'alum pourrait cependant être à l'origine de troubles chroniques occasionnels chez des sujets prédisposés. En effet, de rares sujets vaccinés présentent des myalgies retardées et diffuses, un état d'épuisement chronique et des troubles cognitifs invalidants. Ces symptômes, associés à la présence d'un granulome chargé en particules d'aluminium au niveau du site d'une immunisation préalable avec un vaccin adjuvanté en hydroxyde d'aluminium, permettent de diagnostiquer une condition pathologique décrite au laboratoire comme la Myofasciite à Macrophages (MFM).

Des études antérieures réalisées chez la souris indiquent que l'adjuvant injecté dans le muscle est en partie transporté à distance par des cellules de la lignée monocyttaire, d'abord vers les ganglions lymphatiques de drainage puis, via le canal thoracique, vers la circulation sanguine, avec une accumulation retardée et progressive dans le cerveau. Quoique constante, la pénétration cérébrale reste extrêmement faible en conditions normales, ce qui est cohérent avec la bonne tolérance générale à cet adjuvant malgré son fort potentiel neurotoxique.

Chez les patients MFM, des mutations génétiques ponctuelles touchant un mécanisme de détoxification cellulaire (l'autophagie) qui entre en jeu dans l'élimination de l'alum suite à une vaccination ont été mises en avant.

Le présent projet repose sur l'hypothèse qu'un défaut dans le mécanisme autophagique permettrait un transport plus important de l'alum vaccinal jusqu'au cerveau, où il induirait un effet neurotoxique conduisant aux troubles observés chez les patients MFM. Notre but est de comprendre l'implication de l'autophagie dans les mécanismes de transport de l'alum vaccinal depuis le muscle injecté jusqu'au cerveau et l'effet de l'accumulation cérébrale de l'alum par une étude comportementale réalisée chez la souris, afin de mettre en avant d'éventuels troubles cognitifs communs avec les patients MFM.

Cette étude, complémentaire d'une étude similaire menée sur des souris mâles, sera réalisée sur 132 souris C57BL/6J femelles âgées de 2 mois en début d'expérimentation. La pertinence de cette étude complémentaire est justifiée par l'intérêt d'évaluer une potentielle différence d'effets de l'alum en fonction du sexe des individus. En effet des différences de réponses à une exposition à des particules d'aluminium d'une part, et à une stimulation du système immunitaire d'autre part, liées au sexe des animaux, ont été observées précédemment.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la distribution systémique d'un agent pharmacologique ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude *in vitro*. La souche de souris C57BL/6J a été sélectionnée pour sa consanguinité réduisant la variabilité interindividuelle. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Notre protocole expérimental ne comprend pas de procédure a priori douloureuse mais les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

7823 Le marché mondial de la chirurgie reconstructrice ne cesse de progresser ces dernières années. Selon l'Observatoire Mondial du Marché et de la Profession, ce marché a bondi de 10% en un an, en 2012.

En France, les technologies non chirurgicales, à base de produits injectables progressent, au point que ces interventions dominent aujourd'hui ce marché. La recherche de nouveaux produits, performants et sains pour le patient, est donc plus que jamais nécessaire.

Ce projet a pour objectif de tester et évaluer des dispositifs médicaux injectables de comblement sur différents modèles animaux. Il comporte plusieurs protocoles visant à évaluer leur comportement après injections sous la peau, sous le derme ou sous le muscle chez les rongeurs ou le lapin.

Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'évolution des produits injectés au cours du temps. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement une anesthésie) et ne nécessitent pas d'euthanasie d'animaux au cours de l'étude (suivi des mêmes animaux au cours du temps). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et s'inscrivent donc dans une démarche éthique de réduction du nombre d'animaux.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre d'animaux (maximum 40 par étude) sera variable en fonction du nombre de produits à tester et/ou du nombre de zones d'injection (soit 10 études dans chaque espèce) pour un total de 400 rats, de 400 cobayes et 400 lapins au maximum sur l'ensemble du projet. Soit 1200 animaux utilisés dans le cadre de ce projet.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de produits injectés dans un organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que la zone d'injection, les tissus environnants, l'activité de l'animal, etc.

L'espèce sera choisie en fonction du type d'injection et d'imagerie. Les rongeurs ont été choisis afin de tester les différentes techniques d'injections envisageables chez l'homme. Par exemple, le cobaye est aujourd'hui une espèce référence en terme d'injection intradermique, tandis que le rat sera privilégié pour les injections sous-cutanées (volumes injectables plus important que chez la souris, permettant un suivi en imagerie médicale). Le lapin a quant à lui été choisi afin de tester des volumes plus importants et ainsi mimer les volumes d'injections les plus importants réalisés chez l'humain.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront définis tout au long de ces études. Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans le mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles formulations de produits de comblements pour la chirurgie reconstructrice.

7824 Les traitements actuels utilisés en chimiothérapie font appel à des molécules qui, si elles restent dans la circulation sanguine et/ou se distribuent de façon générale avec une absence de spécificité d'organes ou de tissus, peuvent générer une toxicité dite périphérique. L'objectif de ce projet est de coupler le traitement à un nano-objet dans le but d'optimiser la biodistribution de la molécule et ainsi améliorer le ratio bénéfice-risque des traitements systémiques en oncologie (amélioration d'efficacité, réduction de toxicité). Il s'agit donc de comparer la biodistribution de la composition thérapeutique (molécule thérapeutique + nano-objet) et de la molécule thérapeutique (traitement de référence utilisé chez les patients). Le nano-objet est une nanoparticule organique qui est synthétisé avec des matières premières approuvées par les autorités sanitaires américaines. Différentes compositions thérapeutiques (molécule thérapeutique + nano-objet) seront testées durant ce projet afin d'évaluer l'apport de différents nano-objets sur la biodistribution des différentes molécules thérapeutiques. Dans un premier temps, chaque composition thérapeutique sera testée sur animaux sains, puis les compositions thérapeutiques pertinentes seront évaluées sur animaux porteurs de tumeurs.

Ce projet se divise en deux parties. La première partie correspondant à des études de biodistribution pour évaluer l'accumulation de la composition thérapeutique versus le traitement de référence dans les organes et tissus d'un animal sain. La seconde partie évaluant les mêmes paramètres sur des animaux porteurs de tumeurs xénotransplantées.

Pour la première partie, 10 études identiques avec 40 souris seront incluses, soit 400 animaux. Pour la seconde partie, 10 études identiques avec 80 souris et par lignée tumorale (3 modèles) seront incluses, soit 2400 animaux. Au maximum, 2800 animaux seront utilisés sur la durée du projet.

Cette évaluation sera faite par l'utilisation de l'imagerie médicale. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasive et de pouvoir réaliser des observations à différents pas de temps sur le même animal. Ceci permet de restreindre le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir ces informations.

La sélection de cette espèce de rongeur est basée sur le fait que le modèle de tumeur humaine xénotransplantée chez la souris immunodéprimée est le modèle de référence pour l'étude des traitements anti-cancéreux. Pour la seconde partie, le nombre maximum d'animaux requis a été défini en fonction

du pourcentage de prise de greffe des modèles tumoraux utilisés et la nécessité d'obtenir un nombre suffisant d'animaux présentant une bonne prise tumorale afin d'obtenir des résultats représentatifs tout en limitant le nombre d'animaux pour chaque étude. Ceci permettra de ne pas compromettre l'objectif scientifique du projet en évitant notamment de devoir dupliquer les expériences si le pourcentage de prise de greffe devait être trop faible. Le nombre de 8 animaux par groupe a été choisi afin d'obtenir des résultats représentatifs et pertinents tout en limitant le nombre d'animaux par groupe et de manière à prendre en compte l'hétérogénéité de croissance tumorale lorsqu'applicable.

Par ailleurs, la détermination de points limites précis ainsi que des mesures permettant de soulager la douleur ou l'inconfort ont été établis afin de réduire, supprimer ou soulager au maximum l'inconfort, la douleur et l'angoisse subie par les animaux. 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.

7825 Les vaccins antirabiques inactivés à usage vétérinaire ou humain mis sur le marché français/européen doivent faire l'objet d'un contrôle qualité réglementaire démontrant que leur efficacité dépasse bien une norme internationale requise. Ce contrôle d'activité doit être réalisé par un test sur souris décrit dans la Pharmacopée Européenne. La souris est une espèce très largement utilisée pour les expérimentations dans le domaine de la rage car elle présente une très bonne sensibilité à ce virus. Le présent projet vise à utiliser 2 méthodes pour la détermination de l'activité des vaccins antirabiques :

- La méthode d'épreuve virale sur souris ou test NIH (pour les vaccins à usage vétérinaire et les vaccins à usage humain).
- Le test sérologique d'activité ou TSA (pour les vaccins vétérinaires uniquement)

Le test NIH est une méthode qui permet de déterminer de façon quantitative l'activité d'un vaccin. Elle repose sur l'immunisation de 2 groupes de souris, l'un avec des dilutions d'un vaccin de référence (d'activité connue) et l'autre avec des dilutions du vaccin à tester, suivie d'une épreuve de virus rabique fixe par voie intracérébrale. Les souris sont gardées en observation 28 jours. La Dose Efficace 50 (dose protégeant 50% de l'effectif vacciné ou DE50) des deux vaccins est alors déterminée à partir du nombre de survivants. L'activité relative du vaccin à tester est ensuite calculée par comparaison de sa DE50 avec celle du vaccin de référence.

Le TSA est une méthode alternative au test NIH qui permet une détermination qualitative de l'activité d'un vaccin par un test sérologique. Il repose sur la vaccination de 2 lots de souris (1 lot immunisé par un vaccin à tester et 1 lot immunisé par un vaccin antirabique de référence) chez lesquelles on comparera les taux en anticorps antirabiques obtenus. Le TSA permet de réduire de façon significative le nombre d'animaux utilisés (20 souris vs 120 pour le NIH) et de s'affranchir des traumatismes liés à l'épreuve virale et aux signes cliniques liés au développement de l'infection rabique rencontrés dans le test NIH. L'usage du TSA est cependant réservé aux vaccins à usage vétérinaires dont l'historique a montré que les lots possèdent une activité largement supérieure au seuil minimum requis.

Toutes les souris du projet reçoivent un enrichissement de leur milieu (abris, morceaux de bois à ronger, cellulose pour la confection de nid) et sont contrôlés quotidiennement afin de vérifier leur état de santé. Des points limites sont par ailleurs appliqués pour les souris utilisés pour les tests NIH.

Le nombre de lots de vaccins qui seront mis sur le marché est difficilement prévisible, cependant, en se basant sur l'activité des 3 dernières années, une utilisation d'environ 17000 souris (14400 pour le test NIH et 2600 pour le TSA) est estimée sur les 5 années du projet.

7826 L'autophagie est un processus cellulaire permettant la dégradation et le recyclage de protéines ou d'organelles. De nombreuses études des différentes maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson, ou d'Alzheimer, ou de Huntington montrent qu'une altération de l'autophagie participe à l'accumulation de protéines anormales et toxiques et ainsi contribue aux processus neurodégénératifs. Le cil primaire est une organelle cellulaire qui a été identifié comme induisant l'activation de l'autophagie en recrutant des protéines associées. La protéine IFT88 est une des protéines requises pour la ciliogenèse, par contre sa présence pendant l'embryogenèse est indispensable pour le développement de l'embryon. Les modèles murins d'inactivation constitutif du

gène pour l'étude de son rôle, sont donc létaux. Il faut avoir recours à des modèles inductibles croisés avec des lignées rapportrices permettant l'inactivation du gène IFT88 de façon ciblée dans l'espace et le temps. Ce projet a pour but de créer une nouvelle lignée murine par croisement d'une lignée IFT 88 inductible avec une lignée Cre recombinase permettant son inactivation dans les neurones de projection dans le cerveau adulte. Les 2 lignées utilisées ne présentent, quant à elles, pas de phénotype particulier. Ce projet permettra de vérifier l'absence de phénotype dommageable. La création de ces lignées et croisements nécessitera 45 animaux (tous génotypes confondus).

Pour le respect de la règle des 3R, l'élevage sera minimisé afin de ne produire que les animaux nécessaires. L'étude de l'implication de la protéine IFT88 dans l'accumulation de protéines anormales dans les neurones en vieillissement ne peut être à ce jour faite avec des modèles *in vitro*. Si le constat d'un phénotype nocif est fait, les mesures spécifiques seront prises pour le bien être de ces animaux, qui sera pris en compte à chaque étape.

7827 Une fistule est une communication anormale entre deux cavités qui a pour conséquence le déversement du contenu d'une cavité dans l'autre cavité. La fistule anastomotique résulte d'une mauvaise cicatrisation de l'anastomose (suture entre les deux parties du côlon) et représente la plus importante complication et cause de mortalité après résection colorectale. Elle touche des patients opérés pour cancer du côlon, du rectum ou maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. Les fistules engendrent souvent des ré-interventions et un suivi particulièrement onéreux et contraignant.

L'objectif de ce projet vise à réduire le taux de fistules anastomotiques avec un biomatériau résorbable innovant qui assure un renfort dynamique et favorise une régénération tissulaire solide et pérenne de la paroi colorectale.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, un développement et une sélection des meilleurs matériaux sera d'abord réalisé *in vitro* avec des tests mécaniques et des tests de toxicité sur des cellules en culture afin de sélectionner les meilleurs dispositifs. Ces dispositifs seront ensuite évalués avec le recours à l'expérimentation animale car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable le comportement de ces produits dans un organisme entier vivant. Ce comportement dépend de très nombreux facteurs tels que les tissus environnants, l'activité de l'animal.

Les produits seront donc testés chez des souris afin de déterminer la durée de résorption et l'inflammation induite par l'implant puis la performance des implants sera évaluée chez le lapin sur un modèle de fistule colorectale. Sur ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'évolution de la dégradation des biomatériaux. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas l'euthanasie d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et sont donc éthiques.

La souris est une espèce couramment utilisée pour modéliser les réponses de résorption et inflammatoire. Le lapin quant à lui est utilisé dans les modèles de fistules. En effet, l'anatomie du lapin est proche de celle de l'homme et sa taille facilite les actes techniques (injections et actes chirurgicaux) les analyses histologiques et d'imagerie par rapport à des plus petites espèces.

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et d'essayer dans la mesure du possible de les traiter seront mises en place. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi de mettre en place les traitements adaptés le plus rapidement possible.

Le stress des animaux sera limité par le respect d'une période d'acclimatation d'au moins deux semaines pour le lapin et une semaine pour la souris avant le début de l'étude et en conservant les groupes dans le cas d'un hébergement collectif. Les gestes techniques tels que les chirurgies et les injections de traitement seront effectués sous anesthésie afin d'éviter toute souffrance de l'animal.

Lors de chirurgies, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés (antibiotiques pour empêcher une infection de la zone opérée, antalgique pour supprimer la douleur liée à la chirurgie...)

Lors de ce projet, au maximum 5 études de 60 souris seront réalisées pour un total de 300 souris et 4 études de 30 lapins pour un total de 120 lapins.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché un nouveau dispositif médical innovant pour la chirurgie colorectale.

7828 Actuellement dans le monde, on compte 40 millions d'épileptiques, principalement des enfants, des adolescents et des personnes âgées.

L'épilepsie est une pathologie neurologique qui se caractérise par un dysfonctionnement transitoire d'un groupe de neurones.

Nous nous sommes penchés sur l'épilepsie absence, une des formes de l'épilepsie. L'épilepsie absence est généralisée (touche les 2 hémisphères cérébraux en même temps) et est non convulsive. Les neurones ont des décharges électriques anormales, régulières, synchronisées et bilatérales, en provenance du cortex cérébral. Les crises sont visibles à l'électroencéphalogramme (EEG). Les personnes atteintes sont, pendant les crises, incapables de répondre aux stimulations provenant de leur environnement. Leurs activités motrices sont stoppées et la conscience des patients est altérée. À la suite d'une crise, les épileptiques ne se rappellent pas de cet épisode. Ces crises surviennent le plus souvent plusieurs fois par jour. Elles apparaissent et disparaissent spontanément à chaque fois.

Les épilepsies absence se manifestent essentiellement chez les enfants. Elles touchent environ 5 à 10% des enfants épileptiques.

Cette forme d'épilepsie a une réponse aux antiépileptiques différente de celle observée dans les autres formes d'épilepsie ; en effet, certains antiépileptiques provoquent des aggravations des crises.

Actuellement, les composés en développement sont obligatoirement évalués. Il en va de même pour les antiépileptiques.

Les antiépileptiques peuvent avoir des effets aggravants sur les épilepsies généralisées, en particulier pour celles de type absence. Il est donc primordial de tester leur efficacité sur un modèle biologique animal avant d'effectuer des essais cliniques chez l'être humain.

Des rats Wistar, présentant spontanément des décharges épileptiques de type absence, ont été sélectionnés et reproduits entre eux, jusqu'à aboutir à la souche GAERS.

Au cours des 20 dernières années, le rat GAERS est devenu un modèle de référence pour évaluer de nouvelles molécules antiépileptique. En effet ces animaux présentent des crises ayant les mêmes caractéristiques électrophysiologies et pharmacologiques que celles observées chez l'humain.

Les EEG des GAERS montrent le début et la fin abruptes d'une crise, En outre, les GAERS ont un comportement similaire à celui d'un humain pendant une crise absence : ils ont une activité motrice figée.

D'un point de vue pharmacologique, chez le GAERS, les crises sont supprimées par des antiépileptiques comme le valproate, l'ethosuximide ou le lévétiracétam alors que la carbamazépine, le phénytoïne ou le préalpin (qui sont 3 antiépileptiques reconnus) aggravent les crises de type absence. On observe les mêmes réponses à ces médicaments chez l'humain.

Ce modèle offre une vraie opportunité pour identifier les effets des molécules antiépileptiques en développement pour les crises de types absence.

Afin de pouvoir répondre au mieux aux besoins des industriels et de l'éthique animale, nous réalisons des EEG sur des rats GAERS. Grâce à ces enregistrements, nous pouvons quantifier l'effet d'une molécule sur les crises absence et prédire si cette molécule a un effet bénéfique, neutre ou néfaste.

Les animaux seront observés au moins une fois par jour afin d'identifier tout inconfort, douleur ou détresses. Une échelle de cotation de souffrance base sur des signes indicatifs de gêne ou de douleur sera utilisée afin d'évaluer l'état général de chaque animal et de définir le point limite, permettant de prendre les dispositions adéquates le plus rapidement possible pour préserver le bien-être de l'animal.

Des groupes de 12 animaux sont créés pour pouvoir fournir des données statistiquement exploitables. Dans le but de réduire le nombre d'animaux, les animaux sont traitées en cross over (tous les animaux reçoivent toutes les molécules avec à chaque fois une vérification de l'EEG avant une nouvelle

administration - chaque animal est son propre contrôle). Chaque animal a deux voies d'enregistrement possible : si une n'est pas exploitable, il y a une 2ème voie d'enregistrement exploitable. Tout au long des expérimentations, le bien-être des animaux est vérifié et validé. Nombre total d'animaux : 720

7829 Dans le système nerveux, l'information se propage d'un neurone à l'autre par des synapses par le biais de neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique et qui comme une clé dans une serrure, vont activer des récepteurs spécifiques insérés dans la membrane des neurones. Ces récepteurs codent ensuite un signal électrique capable de se propager à son tour. La connexion entre deux neurones n'est pas figée, mais dépend des activités antérieures des neurones et de leur « utilisation » de cette connexion et ceci grâce à la plasticité synaptique qui est la propriété que les synapses ont de changer en force en fonction de l'usage qui en est fait. Elle permet d'expliquer de nombreuses formes de mémoire simple présentes chez tous les individus présentant un système nerveux, même peu développé. La neurotransmission peut donc être excitatrice, inhibitrice ou modulatrice. La transmission excitatrice se fait principalement grâce à une petite molécule, le glutamate, un acide aminé. Une des familles de ces récepteurs spécifiques dit AMPA sont particulièrement impliqués dans les phénomènes de plasticité synaptique qui permettent de changer continuellement le niveau de communication entre neurones. Ce phénomène nous permet de modifier nos réponses comportementales lors d'événements déjà rencontrés, et donc l'apprentissage et la mémorisation. Notre groupe a montré l'importance du mouvement de ces récepteurs dans la membrane du neurone pour faire fonctionner cette plasticité synaptique qui permet la mise en place de mémoires plus labiles, telles que les mémoires de travail, ainsi que de permettre d'adapter notre réponse comportementale lors de situations complexes, un phénomène appelé flexibilité cognitive.

En effet, en utilisant *in vitro* des cultures de neurones de la région de l'hippocampe du cerveau de souris et des tranches d'hippocampe en culture, en immobilisant ces récepteurs AMPA avec des molécules spécifiques, nous avons pu modifier la plasticité à court, moyen et long terme (échelles de temps de la milliseconde à une heure). Cette immobilisation est difficile à contrôler avec les outils utilisés. Pour mieux la manipuler, afin de progresser dans la compréhension des mécanismes moléculaires qui sous-tendent les différents types de mémoire, notre groupe va développer des récepteurs modifiés et les introduire dans la région de l'hippocampe du cerveau par la technique d'électroporation *in utero* chez la souris. Ces injections se font au 16ème jour de gestation, stade du développement embryonnaire où la neurogenèse est importante et l'incorporation des récepteurs modifiés maximale. Entre 15 et 21 jours après la naissance, le cerveau des souriceaux sera prélevé pour des études d'imagerie innovantes sur des coupes de tissu frais, et d'électrophysiologie pour mesurer l'efficacité des ligands utilisés pour immobiliser ces récepteurs AMPA modifiés. Deux femelles gestantes seront utilisées chaque semaine pour fournir ce matériel aux expérimentateurs ce qui représente pour ce projet de 5 ans, 420 femelles gestantes C57Bl6, et de 2520 descendants (le nombre moyen d'embryons par femelle C57Bl6/J est de 6). Pour réduire le nombre d'animaux dans le cadre du respect de la règle des 3R, nous avons fait le choix de confier cette approche seulement à deux expérimentateurs afin que leur expertise permette d'augmenter le nombre de fœtus bien électroporés. Il est possible d'introduire nos récepteurs modifiés dans des tranches en culture mais avec une efficacité extrêmement faible par rapport à cette technique utilisant des animaux vivants. Son utilisation permettra de répondre à nos questions scientifiques de façon plus rapide et efficace, réduisant ainsi au final le nombre des animaux total pour le projet. Dans le respect du R de raffiner de la règle des 3R, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque étape. Une attention particulière pour le raffinement de notre procédure de chirurgie sera apportée pour limiter, soulager douleur et stress des animaux en utilisant des molécules anesthésiques et antalgiques efficaces et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Des points limites spécifiques de chaque âge, suffisamment précoces seront définis pour soulager les douleurs, et le stress des animaux tout au long de leur vie.

7830 Les uvéites sont des inflammations, réactions de défense de l'organisme à une agression, de la partie de l'œil appelée uvée. L'uvéite est composée de trois tissus : l'iris (partie colorée à l'avant de l'œil qui se dilate pour laisser passer plus ou moins de lumière vers la rétine), le corps ciliaire (ensemble de muscles qui permettent de voir net les images en fonction des distances) et la choroïde (tissu

vasculaire qui nourrit la rétine au fond de l'œil). Selon le tissu touché par l'inflammation l'uvéite est antérieure, intermédiaire ou postérieure, et panuvéite si la totalité des structures est atteinte. Les uvéites peuvent être aiguës ou chroniques, toucher un œil ou les deux. Elles entraînent une rougeur de l'œil, altèrent la vision, occasionnant des troubles ou l'apparition de taches, et peuvent conduire à la cécité en l'absence de soins.

Dans les pays occidentaux, l'incidence des uvéites serait de 17 à 52 nouveaux cas pour 100 000 habitant par an, elles seraient à l'origine de 5 à 20% des cas de cécité.

Les causes des uvéites sont variées, elles peuvent être d'origine infectieuse (toxoplasmose, herpès, zona, maladie de Lyme...), associées à une pathologie systémique ou auto-immune (spondylarthrite ankylosante, polyarthrite rhumatoïde, sarcoïdose, diabète.). Dans 30 à 50 % des cas la cause de l'uvéite n'est pas connue, on parle d'uvéite idiopathique.

L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, d'un modèle expérimental d'uvéite d'origine infectieuse et d'un modèle expérimental d'uvéite d'origine auto-immune, chez le rongeur et le lapin, afin de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux visant à diminuer l'inflammation.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 4500 rats, 4500 souris, 2250 lapins adultes. Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés, en groupe pour les rongeurs et individuellement ou par deux pour les lapins, 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.

7831 La chirurgie assistée par ordinateur (CAO) regroupe un ensemble d'outils informatiques destinés à aider le chirurgien dans la préparation et la réalisation d'une opération, particulièrement en chirurgie des tissus mous (chirurgie viscérale, urologique ou cardiaque) et en chirurgie orthopédique. Elle a pour objectif de faciliter la réalisation des gestes diagnostiques ou thérapeutiques par le chirurgien, afin qu'ils soient les plus précis, les plus efficaces et les moins invasifs possible. Les « robots » chirurgicaux et les systèmes de traitement numérique de l'image en font partie. Le recours aux « robots » chirurgicaux fait suite au développement de la chirurgie mini-invasive et l'avancée des techniques d'imagerie médicale (réalité virtuelle) afin d'améliorer la précision et la reproductibilité du geste chirurgical.

Les avantages potentiels de la CAO pour les chirurgiens concernent des aspects thérapeutiques, tels que la réduction du tremblement et de la fatigue, un traitement informatisé de l'image, une vidéo 3D nette pendant toute la durée de l'intervention et une fiabilité du système plus importante, entraînant une plus grande précision du geste chirurgicale, comme, par exemple, une meilleure précision du positionnement de prothèses en orthopédie. Les avantages peuvent aussi être éducationnels, avec des applications dans la formation des chirurgiens à des techniques opératoires complexes, la planification précise d'interventions chirurgicales délicates et la téléassistance en opérations extérieures (OPEX) dans le cadre de la chirurgie et la médecine militaire.

Le projet de recherche a pour objectif la validation de robots ou d'éléments robotiques innovants, l'apprentissage des personnels de santé, le développement de nouvelles stratégies pouvant réduire le traumatisme tissulaire, améliorer le diagnostic et pallier une dysfonction. Ces dispositifs innovants doivent être étudiés sur des modèles animaux pertinents, dans le but de valider leur faisabilité, leur innocuité et leur efficacité. Ces nouvelles techniques moins invasives et ces approches originales permettront de mettre à profit pour les patients et les équipes soignantes les avancées de la robotique dans un environnement chirurgical et interventionnel.

Le projet prévoit le recours à des modèles porcins, ovins, canins et bovins, justifiés par une taille et une fonction tissulaire proche de ceux de l'Homme, avec un maximum respectivement de 100 porcins,

100 ovins, 20 bovins et 20 canins. Le nombre a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques des études.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening, IRM, scanner / reconstruction 3D. Les procédures expérimentales sont classées légères, modérées, sévères ou sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires afin de garantir le bien-être animal.

7832 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est le 5ème cancer le plus fréquent au monde et un des plus meurtriers. Dans la plupart des cas, les CHCs sont une complication tardive d'une maladie chronique du foie, elle-même due à une infection par les virus de l'hépatite B ou C, l'excès d'alcool. Le travail du laboratoire a montré que la Reptine est surexprimée dans 75% des CHC et associée à un mauvais pronostic. Lorsqu'on bloque son expression dans des tumeurs xénogreffes, les tumeurs régressent suggérant qu'elle pourrait être une bonne cible thérapeutique.

Aujourd'hui, les seuls traitements efficaces du CHC sont la résection de la tumeur et la transplantation hépatique applicables qu'à un faible nombre de cas. Il est donc nécessaire de trouver d'autres pistes pour le traitement des CHC. A ce jour, il n'y a aucune étude concernant le rôle de la Reptine endogène dans un organisme mammifère entier.

Notre objectif est de comprendre les fonctions de la Reptine dans la physiologie et la pathologie hépatique. Le recours au modèle animal est indispensable à ce projet car il nécessite une évaluation comportementale et physiologique et aucun modèle *in vitro* ne peut reproduire les conditions pathologiques étudiées. Nous avons ainsi généré le modèle Reptinlox/lox en collaboration avec une plateforme de recombinaison homologe. Ces souris seront croisées avec des souris Alb-CreERT2, ce qui nous permet de cibler les hépatocytes de manière inductible par le tamoxifène. Nos approches reposent essentiellement sur l'utilisation de souris transgéniques obtenues par la stratégie Cre-LoxP inductible par injection de tamoxifène et ciblée dans l'hépatocyte (dits Reptin KO). Cette stratégie justifie le choix de la souris pour cette transgénèse particulière.

Afin de simplifier la présentation, nous parlerons désormais uniquement de souris contrôles et de souris Reptine KO ou HET (seulement 1 copie du gène enlevée) et contrôles.

Après croisement, nous aurons alors des animaux d'intérêts Het, KO et contrôles ainsi que des animaux pour alimenter notre production (femelles) au sein de la même portée. Ceci nous permettra de réduire notre nombre d'animaux.

Les animaux seront élevés par fratrie dès le sevrage. Des mesures de surveillance seront réalisées par les intervenants et le personnel de l'animalerie afin de s'assurer que tout au long du projet, les animaux sont en bonne santé, sans comportement anormal ni signe de souffrance (points limites adaptés). Tout problème concernant l'état de santé des animaux sera communiqué, par téléphone, à l'expérimentateur qui évaluera avec le personnel de l'animalerie le comportement de l'animal sur des critères objectifs en cas de souffrance. Une surveillance spécifique (points limites sont décrits plus bas) par les responsables du projet sera mise en place pour chaque procédure.

Seuls les animaux mâles assignés à un protocole seront invalidés pour la Reptine dans le foie. Au total 285 animaux seront utilisés pour l'ensemble de ce projet. Les animaux traités ne seront pas utilisés pour la production d'animaux. Cette procédure n'aura donc aucun impact sur la reproduction des animaux.

La présente demande d'autorisation du projet expérimental de caractérisation phénotypique liée à la perte du gène de la Reptine dans le foie est établie en parallèle de la demande d'autorisation de création et d'élevage de souris Reptinlox/lox ; AlbCreERT2.

7833 Le vieillissement est caractérisé par une modification de la composition corporelle et notamment une diminution de la masse maigre. Ce dernier phénomène nommé sarcopénie correspond au déclin de la masse et des fonctions musculaires squelettiques avec l'âge. Ainsi, la perte progressive de la

masse musculaire avec l'âge peut atteindre 11 kg entre 30 et 80 ans. Cette perte musculaire aboutit à de nombreuses conséquences fonctionnelles et métaboliques dont une réduction de la force participant ainsi à la perte d'autonomie et au risque de chute chez le sujet âgé. Le muscle est un réservoir d'acides aminés mobilisables en situation de besoin. De fait, la sarcopénie contribue à réduire les capacités de l'organisme âgé à répondre à un stress environnemental (infection bactérienne, inflammation, ...). Cette perte musculaire liée à l'âge s'accroît et s'aggrave chez les patients âgés dénutris. En France, la prévalence de la dénutrition protéine-énergétique est de 15 à 38% chez les personnes âgées en établissement de soins et de 30 à 70% chez les personnes âgées hospitalisées. La dénutrition des patients sarcopéniques conduit à un état de fragilité extrême et de dépendance, et contribue au développement de la morbidité et à l'augmentation de la mortalité. Dans cette situation physiopathologique de dénutrition, actuellement, les protéines apportées aux patients âgés pour favoriser la reconstruction musculaire sont d'origine animale. Or, l'apport d'une nouvelle source protéique d'origine végétale à la fois riche en protéines et en micronutriments susceptibles de faciliter la digestion de ces protéines et l'assimilation des acides aminés ainsi libérés est potentiellement intéressante. Néanmoins, cette protéine végétale doit être de bonne qualité nutritionnelle : le profil en acides aminés doit correspondre aux besoins.

Nous souhaitons mettre en place un protocole utilisant des rats mâles Wistar âgés dénutris, scientifiquement reconnus pour être un bon modèle d'étude aboutissant aux signes de dénutrition classiquement décrits chez l'Homme âgé, à savoir une diminution importante du poids corporel, une réduction des marqueurs nutritionnels tels que l'albumine sanguine et un déclin de la masse musculaire, ainsi qu'un ensemble d'altérations métaboliques correspondant à un état de dénutrition. L'impact d'une protéine d'origine végétale lors de la phase de renutrition et de récupération sera évalué sur la force, la mobilité, la masse et le métabolisme protéique des muscles squelettiques chez ces rats âgés. Pendant la mise en place du modèle de dénutrition (phase de dénutrition), deux groupes de rats âgés seront nourris pendant 12 semaines soit avec un régime témoin ad libitum (12 rats) ou soit avec ce même régime témoin mais la quantité quotidienne fournie aux animaux correspondra à 50% des apports ad libitum spontanés de ces mêmes animaux (apports mesurés pendant la phase d'acclimatation) (72 rats). A l'issue de cette première phase, les 12 rats témoins et 12 rats dénutris seront euthanasiés. Les 60 rats âgés dénutris restants seront répartis en 5 groupes de 12 rats. Ils seront soumis à une phase de renutrition de 3 semaines pendant laquelle ils recevront 90% de leurs apports ad libitum spontanés sous la forme de : 1-le régime témoin, 2-un régime contenant une protéine laitière rapide de référence utilisée classiquement dans les solutions de renutrition chez les patients dénutris, 3-un régime contenant la protéine d'origine végétale, 4-un régime contenant la protéine d'origine végétale complétée avec de la leucine (pour être isoleucine avec la protéine laitière de référence) et 5-un régime contenant la protéine d'origine végétale complétée avec de la méthionine (pour être iso-méthionine avec la protéine laitière de référence). Avant le sacrifice des animaux, nous mesurerons systématiquement des paramètres anthropométriques (poids, masse grasse, masse maigre) et des paramètres fonctionnels musculaires (force, mobilité spontanée des animaux). Des mesures de synthèse protéique musculaire seront également réalisées sur chaque groupe d'animaux. Nous utiliserons au total 84 animaux. Les résultats obtenus nous permettront de déterminer si cette source végétale de protéine pourrait à terme être utilisée pour favoriser la récupération musculaire des patients âgés dénutris.

L'ensemble du projet comporte 6 procédures dont le degré de gravité va de sévère pour 1 d'entre elles à sans réveil pour la dernière.

Un maximum de mesures seront prises afin de respecter la règle des 3R (raffiner, réduire et remplacer). Ainsi le nombre d'animaux par groupe est réduit à son minimum et limité à 12 tout en permettant d'effectuer des statistiques fiables avec une puissance suffisante. Des points limites précis sont proposés pour réduire la souffrance des animaux s'il y a lieu notamment pendant la phase de dénutrition. Les paramètres mesurés dans ce projet (efficacité de renutrition, locomotion, force) ne permettent pas l'utilisation d'un modèle cellulaire.

7834 A chaque instant nous devons acquérir de nouvelles informations et en rappeler d'anciennes. Ces processus cognitifs, hautement dynamiques, sont contrôlés par la capacité des neurones de notre cerveau à communiquer entre eux et modifier l'efficacité de cette communication. Nous essayons de comprendre, d'un point de vue moléculaire, comment l'excitation concertée d'ensembles de neurones

peut encoder nos actions et expériences sensorielles. Prenant la souris comme modèle expérimental, l'objectif de ce projet est d'enregistrer, à l'aide d'une fibre optique implantée dans la tête de l'animal, la signalisation neuronale sous-tendant un apprentissage et la mémorisation de cette tâche. Les procédures expérimentales composant cette saisine permettront de valider l'utilisation 1° des outils moléculaires (par expression virale dans le cerveau des souris de rapporteurs fluorescents de différentes voies de signalisation cellulaires mais aussi d'outils d'optogénétique permettant un contrôle de l'activité neuronale), 2° de la fibre optique et du microscope construit à façon pour enregistrer l'activité des neurones. Ces expériences nécessitent un nombre total de 260 souris.

Le projet présenté vise le développement d'un microscope fibré permettant l'étude de réseaux de neurones au cours du comportement de la souris. Les caractéristiques uniques de ce fibroscope permettront de mesurer l'activité électrique et métabolique de chaque neurone étudié. De plus, il sera possible d'activer ou d'inhiber tout ou partie du réseau. Les informations collectées permettront alors d'établir les règles d'établissement et de fonctionnement dudit réseau au cours d'un comportement.

La réalisation de cette étude implique l'injection intracérébrale de vecteur pour l'expression d'outils optogénétiques, puis l'expérimentation sur animal anesthésié et éveillé à l'aide du fibroscope.

Nous nous engageons à suivre la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacer : Nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations *ex vivo* avec le minimum de détresse pour l'animal. Les phénomènes physiologiques que nous souhaitons étudier sont très complexes et ne sont pas à ce jour reproductibles par des modèles *in vitro*.

Réduire : Nous essayerons de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal : i) activité neuronale *in vivo*; ii) rapporteurs d'activité post-mortem iii) contenu protéique de régions spécifiques du cerveau.

Raffiner : Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales, en utilisant des techniques limitant au maximum l'impact sur l'animal et en prenant toutes précautions visant à limiter la souffrance de l'animal.

7835 Les maladies hépatiques constituent un problème majeur de santé publique. Cependant, même si les hépatites virales et la maladie hépatique alcoolique sont cruciales au niveau mondial, elles ne représentent pas la majorité des affections hépatiques. En effet, les pathologies hépatiques associées à l'obésité (NAFLD) représentent la première cause de maladie du foie dans les pays occidentaux. Les NAFLD regroupent différents stades d'atteintes hépatiques allant de la stéatose simple (foie gras) jusqu'aux stades les plus graves (inflammation, cirrhose).

Si l'alimentation joue un rôle important dans le développement de cette maladie, la génétique est également impliquée rendant les individus plus ou moins susceptibles. Cette maladie hépatique a par ailleurs été associée à des changements de composition du microbiote intestinal et un rôle causal de ce microbiote dans le développement de ces atteintes hépatiques a été démontré chez la souris.

Dans ce cadre, l'objectif de cette étude est d'évaluer les contributions du microbiote intestinal dans la susceptibilité au développement de la stéatose en fonction de facteurs génétiques.

Pour cela, nous utiliserons des souris C57BL/6J axéniques (ne comportant pas de bactéries dans l'intestin ou sur d'autres surfaces du corps). Nous implanterons à des souris axéniques différents microbiotes venant de différentes souches génétiques de souris, des souris C57BL/6J (susceptibles au développement de la stéatose) des souris A/J (résistantes au développement de la stéatose) mais aussi des microbiotes provenant de 4 types de souris génétiquement modifiées dont la susceptibilité à la stéatose est soit faible (2), soit élevée (2). Toutes ces souris recevront un régime riche en graisses et nous évaluerons le développement de la stéatose.

Le projet, portant sur la relation entre l'alimentation, l'hôte et ses bactéries, met en jeu des interactions complexes, il est donc impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique.

Lors de la conception du protocole expérimental nous avons déterminé et réduit le nombre d'animaux au minimum nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

Le projet prévoit ainsi le recours à un minimum nécessaire de 84 souris sur 5 ans (soit 7 groupes de 12 souris). Chaque groupe sera composé de 12 souris ce qui est un minimum pour obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Les souris auront comme alimentation un régime spécial riche en lipides. Elles seront pesées toutes les semaines. Durant l'expérimentation nous collecterons des fèces. Le dernier jour avant l'euthanasie nous ferons un test de tolérance au glucose sur l'ensemble des animaux de ce protocole (mesure de la glycémie sanguine).

Compte tenu de la faible invasivité du protocole, aucune souffrance animale n'est attendue dans cette étude. Toutes les souris auront dans chaque cage un enrichissement de milieu par l'ajout de Sopalin (pour faire le nid) et d'un bâton de bois à ronger. Les souris seront 3 par cage pour éviter l'isolement. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long de l'expérience. Cela nous permettra d'intervenir rapidement et de façon appropriée si un problème survenait.

7836 Depuis une dizaine d'années, un intérêt croissant est porté sur le développement de plasmas froids à pression atmosphérique (PFPA) pour des applications biomédicales visant à la mise en place de nouvelles thérapies. Ceci a donné naissance à un nouveau domaine scientifique interdisciplinaire connu sous le nom de Plasma Medicine. La technique des plasmas froids concerne diverses indications en clinique dont certaines en maladies infectieuses. De par ses propriétés de déterSION et de cicatrisation, l'utilisation de la technique du plasma froid est susceptible d'avoir des indications thérapeutiques dans le domaine des plaies et ulcérations infectées d'origine traumatique ou post chirurgicale, des escarres sacrés associés à des paraplégies ou des séquelles de sclérose en plaque, des ulcères de Buruli, ... Des sources de Plasma Froid sont déjà utilisées en clinique (particulièrement en Allemagne). Les sources actuelles ne permettent de traiter que de petites surfaces, les rendant inappropriées pour des traitements impliquant des surfaces de grandes dimensions, notamment dans le domaine des plaies et des ulcérations infectées

Trois équipes, apportant chacune leur expertise et des outils spécifiques ont reçu un financement pour aborder ce problème complexe. La collaboration entre ces trois équipes s'inscrit dans le cadre d'une recherche translationnelle visant à évaluer la tolérance, l'efficacité bactériologique puis l'efficacité clinique des plasmas froids dans le traitement des ulcérations infectieuses par procédé PMJ (PlasmaMultiJets).

En effet la nouvelle source PlasmaMultiJets permet de produire plusieurs jets (jusqu'à plusieurs dizaines) à partir d'un seul générateur de plasma. De par sa conception, cette source compacte, facilement transportable et pilotée par ordinateur, peut être adaptée à une utilisation par un praticien, mais n'a pas encore fait l'objet de tests de tolérance sur des animaux modèles ou sur l'homme.

Avant de passer à une étude pilote clinique, cette étude préclinique aura pour but de définir la tolérance et le protocole optimal d'utilisation du PMJ sur un modèle animal. Les plasmas froids ne causent pas de lésions cutanées sauf en cas d'application très prolongée. Il n'est pas possible d'extrapoler à partir des effets connus d'autres sources plasmas car la composition du plasma (et donc son pouvoir détersif et de cicatrisation) varie suivant la source qui le produit. Les plasmas froids ne causent pas de brûlures thermiques et ne sont pas douloureux mais leur composition chimique (radicaux, ions,..) est agressive en cas d'application excessive. Des souris Nude et des souris C57Bl/6 seront utilisées pour ces études de toxicité avec des durées croissantes d'exposition au plasma froid (en ne passant à la durée supérieure que dans le cas où il n'y a eu aucun effet toxique) afin de définir les durées à ne pas dépasser lors de l'étude clinique qui suivra les essais chez la souris. En cas d'irritation légère de la peau, la situation sera plus comparable à celle des patients. La tolérance vis-à-vis du traitement sera déterminée par des méthodes classiques : inspection visuelle de la zone de peau traitée avec prise de photos, mesure de la température de la peau traitée pendant ou juste après le traitement, mesure de la température centrale, suivi du poids, mesure du rythme cardiaque (si possible). De plus, en cas d'effets cutanés, ceux-ci seront confirmés par une analyse histologique. Il est à noter que les paramètres du plasma froid ne seront pas modifiés à l'exception de la durée d'exposition et la fréquence de génération des plasmas. La première étape de l'étude consistera à appliquer une seule exposition de plasma en faisant varier la durée de l'application afin de définir, d'abord, la durée minimale d'exposition provoquant une réaction cutanée légère et réversible, ou tout autre effet réversible, et, ensuite, la durée minimale d'exposition provoquant une réaction cutanée importante ou un autre effet adverse. Dès que la durée de traitement générera des lésions réversibles

et de l'inconfort aux souris, des traitements antidouleur seront ajoutés dans l'eau de boisson des souris. Les points limites seront strictement appliqués. La deuxième étape de l'étude consistera à fractionner le traitement c'est-à-dire à faire varier le nombre d'expositions au Plasma Multi Jet afin de définir le nombre optimal de séances de traitement garantissant une bonne tolérance cutanée, ainsi que la fréquence de répétition de ces séances (c'est-à-dire le temps entre deux séances consécutives). Il s'agit d'une étude par escalade de doses. Au maximum 168 souris seront incluses. En effet, si les temps les plus courts n'induisent aucune réaction locale, les mêmes souris seront incluses à nouveau dans l'étude, en appliquant ce traitement local sur une autre partie du dos ou du flanc de la souris, permettant ainsi de réduire le nombre de souris. A noter qu'à cause de la complexité de la structure de la peau et des réactions vasculaires et inflammatoires pouvant être générées, aucun système *in vitro* ne permet de réaliser cette étude de toxicité et remplacer l'animal. En ce qui concerne le raffinement, les procédures les moins contraignantes pour les souris et les plus informatives avant le passage en clinique seront utilisées pour le suivi : photographies, température cutanée, histologie en cas de toxicité c'est-à-dire persistant au-delà de 24 heures. Les animaux bénéficieront en tout temps d'un enrichissement environnemental et les procédures seront faites sous anesthésie.

7837 Les expositions « bruit plus agents chimiques » sont nombreuses en milieu professionnel comme en construction navale. Dans ce projet, nous proposons d'identifier des substances volatiles qui ont la capacité à perturber le réflexe de protection de l'audition : le réflexe de l'oreille moyenne encore appelé réflexe stapédien chez l'Homme. C'est un réflexe qui met en jeu un récepteur, l'oreille, une voie afférente, le nerf auditif, un centre nerveux, le tronc cérébral, une voie efférente et un effecteur, le muscle stapédien. La complexité des mécanismes neurologiques mis en jeu associés au métabolisme des solvants nous interdit l'utilisation de techniques alternatives (cultures de neurones *in vitro* ne répondent pas à des stimulations acoustiques). Seules des expérimentations sur l'animal peuvent être envisagées pour mesurer ce réflexe.

Ce réflexe est essentiel pour la protection de l'audition des salariés. S'il est moins efficace suite à une exposition avec une substance volatile, l'énergie portée par les bruits pénètre plus facilement dans la cochlée ce qui entraîne des traumatismes au niveau des cellules neurosensorielles de l'organe de Corti, et cela provoque ainsi des pertes auditives.

Afin de permettre l'identification de ces substances potentiellement dangereuses, un test *in vivo* a été élaboré au laboratoire. Des solvants aromatiques ont déjà été testés chez le rat adulte mâle en mesurant l'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne de façon non-invasive. Les rats seront hébergés à l'animalerie au moins une semaine avant les expérimentations. Ils seront hébergés dans des cages en polycarbonate de 1032 cm² de surface au sol. Ils seront au moins 2 par cages et bénéficieront d'un environnement enrichi : des tunnels en carton et des bûchettes de bois seront disposés dans les cages. L'éclairage respecte le cycle circadien des rats à raison d'un cycle 12 h/12 h. La température est maintenue à 22 ± 2°C avec un taux d'humidité de 55 ± 10%. La nourriture (Spécial Diets Service) et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Dans ce projet, comportant une seule procédure, les rats sont anesthésiés avant d'être exposés aux solvants par inhalation (2 expositions de 15 minutes chacune). L'amplitude du réflexe de l'oreille moyenne est mesurée pendant toute l'expérimentation et les effets des solvants sont calculés en faisant la différence entre la valeur de l'amplitude pendant l'inhalation de solvant et la valeur de l'amplitude avant l'exposition au solvant. Au terme de la seconde exposition de 15 minutes, les animaux sont mis à mort. Il se passe environ deux heures entre l'induction de l'anesthésie et la mise à mort.

Il est à noter que les animaux sont maintenus anesthésiés pendant toute l'expérimentation et que la profondeur de l'anesthésie est mesurée en temps réel grâce à la mesure de l'amplitude du réflexe ; en effet, ce paramètre est sensible aux anesthésiques et il diminue avec la profondeur de l'anesthésie. Ainsi, dès son entrée dans la procédure, l'animal est sous surveillance constante et la procédure est arrêtée au premier signe de souffrance, à savoir, convulsions, dyspnée prolongée ou encore coma. Tout arrêt de la procédure conduit à la mise à mort immédiate de l'animal par une dose d'anesthésiques.

Aujourd'hui, ce nouveau projet complétera les résultats précédemment obtenus avec des solvants aromatiques par des substances appartenant à d'autres familles chimiques de façon à comprendre le mécanisme d'action des solvants volatils à l'origine de la perturbation du réflexe. Ces solvants sont :

le perchloroéthylène, le trichloréthylène, la méthyle-éthyle-cétone, l'éthanol, l'acétone et l'acétate d'éthyle. Chaque solvant sera étudié par un groupe de 7 animaux, il faudra donc 49 animaux pour étudiés les effets des solvants, un groupe de 7 témoins et 7 rats surnuméraires seront également nécessaires. Les rats surnuméraires permettront de remplacer les animaux qui ne seront pas admissibles pour le test (otites, absence de réflexe de l'oreille moyenne). Au total, 56 animaux sont donc nécessaires pour ce projet.

Par ailleurs, les effets de ces substances sur le réflexe de l'oreille moyenne sont inconnus à ce jour ; par conséquent ces données seront d'abord utilisées pour identifier les molécules potentiellement dangereuses pour l'audition en présence de bruit. Puis, l'ensemble des données permettra d'élaborer un modèle de l'impact sur le réflexe des substances volatiles. L'exposition au bruit ne peut être réalisé que sur animal vivant. Le modèle animal est indispensable pour obtenir des résultats exploitables.

Cette étude participera donc à l'amélioration de la politique de prévention des salariés.

Ce projet intègre une démarche de réduction du nombre d'animaux ; en effet, un logiciel de puissance statistique, G*power (Université de Düsseldorf), a été utilisé pour calculer le nombre de rats par groupes suffisant pour différencier significativement ces groupes.

7838 La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente. Elle représente un enjeu mondial sur le plan santé publique, social, économique et familial.

Neuropathologiquement, elle se caractérise par la présence de dépôts anormaux de deux types : Abeta en dehors des neurones et de protéine Tau à l'intérieur du neurone. Selon l'hypothèse dite "amyloïde", l'Abéta serait le résultat d'une activité anormale de deux enzymes appelées BACE1 et gamma-secretases. La présence de l'Abeta induirait la perte des neurones et des communications entre les neurones dénommés les synapses. L'ensemble de ces pertes serait responsable des troubles intellectuels. Pour protéger les neurones de cette toxicité, des traitements augmentant l'élimination ou diminuant la production d'Abeta sont en cours de développement. Ils diminuent la charge Abéta dans le cerveau des modèles animaux et des patients atteints de MA. Toutefois, chez l'homme, la question de l'impact de ces traitements sur les neurones et les synapses n'a été exploré qu'une seule fois dans des cerveaux humains. Des effets contradictoires (bénéfiques et délétères) ont été rapportés. Ces analyses ont été menées sur des prélèvements cérébraux issus du premier vaccin chez des patients présentant une maladie avancée. Par ailleurs, l'autopsie était pratiquée des années après la fin du traitement. Ainsi cette étude ne permet pas 1/ d'évaluer l'effet à court et moyen terme sur les neurones et les synapses, 2/ d'évaluer si l'impact neuronal et synaptique dépend du stade de la maladie au moment du traitement. Seule une étude chez l'animal pourra permettre d'étudier ces deux aspects avec une méthodologie scientifiquement rigoureuse. »

Ainsi notre objectif est d'explorer l'impact réel de ces traitements anti-Abéta sur les neurones et les synapses et de proposer un nouveau moyen d'évaluation de l'efficacité biologique (au-delà de la diminution d'Abéta) de ces thérapeutiques. Notre hypothèse de travail postule que ces traitements devraient prévenir significativement la mort neuronale et synaptique, particulièrement quand ils sont instaurés à un stade précoce.

L'objectif principal de notre projet est d'étudier l'impact neuronal et synaptique des classes de traitements anti-Abéta ou d'un traitement combiné associant deux de ces classes. Grâce à ce projet, nous devrions pouvoir :

1/comparer l'efficacité réelle des traitements entre eux et à un traitement combiné

2/évaluer leurs potentiels neuro- et synapto-protecteur,

3/préciser l'hypothèse avancée de l'efficacité accrue d'un traitement précoce sur la protection des neurones et synapses,

4/d'évaluer chez la souris la concordance entre marqueurs du LCR (liquide céphalo-rachidien) et du cerveau de la souffrance synaptique et neuronale

Sur le plan méthodologique, nous utiliserons la souris 5xFAD car c'est l'un des rares modèles présentant une mort neuronale. Les 5xFAD reproduisent les mécanismes de dépôts d'Abéta observés dans la MA. Comme les patients, elles expriment une augmentation de BACE1 et des dépôts d'Abéta qui débutent à l'âge de 2 mois et présentent un déclin cognitif vers l'âge de 6 mois concomitant à un

dysfonctionnement et à une mort neuronale et synaptique. Le pic de mort neuronale est atteint à 9 mois.

Ces souris seront soumises à l'un des 4 types de traitements anti-Abéta ou à une combinaison de deux de ces traitements. Afin de déterminer si l'hypothèse avancée de l'efficacité accrue d'un traitement précoce nous débiterons les traitements à 2 âges différents : 2 mois et 7 mois. Dans les deux cas, les traitements seront maintenus jusqu'à 12 mois, âge auquel les souris passeront des tests comportementaux, seront prélevées (sang et LCR) puis mise à mort afin de récupérer leur cerveau. Afin de limiter au maximum de souris utilisé, nous n'utiliserons qu'un seul groupe "sham" pour le comparer à plusieurs traitements. Au total nous utiliserons 468 souris

Les souris sont maintenues en portoir ventilé à 4 souris / cages maximum. Les cages sont enrichies avec des boules de coton pour permettre aux souris de construire leurs nids. Les procédures expérimentales comportementales choisies sont les moins traumatisantes pour les animaux. Concernant les traitements, en cas de douleur au moment de l'injection l'utilisation d'un antalgique sera mise en place.

Les critères de bien-être sont définis avec précision (poids, comportement ...). Toute douleur sera systématiquement traitée. Après la mise à mort des animaux, les tissus (cerveau) seront prélevés, stockés et dédiés aux analyses moléculaires, biochimiques et histologiques. La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par

- 1/ le fait qu'aucune approche *in vitro* ne permette de rendre compte de façon fiable les interactions présentes au sein d'un tissu tel que le cerveau et des échanges entre cellules, tissus et organes,
- 2/ étude de l'efficacité de ces traitements incluant le passage de la barrière hémato-encéphalique, ce qui ne peut être difficilement reproduit dans les cultures cellulaires,
- 3/ la nécessité d'un modèle permettant l'étude clinique et biologique et la variabilité de réponse aux traitements,
- 4/ la durée des traitements, qui se rapproche de celle de l'Homme, impossible à mettre en place en culture cellulaire,
- 5/ le besoin d'étudier les LCR.

Il est essentiel de connaître l'impact de ces potentiels nouveaux traitements sur les neurones et les synapses. Une neuroprotection appuiera le développement de ces traitements alors que l'absence d'un tel effet, voire l'existence d'une neurotoxicité, apportera des arguments pour arrêter le développement de telles molécules. Ce projet sera réalisé au sein de deux laboratoires, dont une plateforme de comportement pour analyser leur mémoire et un laboratoire de recherche fondamentale afin d'analyser les échantillons biologiques.

7839 L'insuffisance mitrale ischémique (IMR) est par définition la fuite de la valve mitrale secondaire à une atteinte ischémique du cœur (le sang ne circule pas normalement et l'oxygène n'arrive plus jusqu'au cœur).

Actuellement, la revascularisation chirurgicale par pontage associée à la réparation de la valve mitrale représente le traitement chirurgical de référence. Pour les patients présentant une IMR sévère les récentes lignes directrices conseillent une chirurgie valvulaire mitrale sans précision concernant le type de chirurgie : remplacement ou réparation. Les bénéfices d'une chirurgie réparatrice par rapport à une chirurgie de remplacement sont controversés avec des cas de récurrences 2-4 ans après la chirurgie.

Différentes techniques de réparation valvulaire innovantes ont été mises au point, mais aucune de ces techniques n'a montré de résultats significatifs ou sont encore en cours d'évaluation.

La valve mitrale est constituée de 3 éléments : un anneau, un voile constitué de deux valvules et un élément d'attache sous-valvulaire, composé des cordages et des piliers. Dans cette étude, nous avons pensé désolidariser la valve mitrale postérieure de ses éléments d'attache sous valvulaires dont la géométrie est influencée par la dilatation du ventricule et refixer la valve au moyen de néo-cordages à une prothèse d'anneau (anneau mitral prothétique). Ceci permettrait d'éviter le risque d'une récurrence d'insuffisance mitrale.

Une approche analytique chez un modèle gros animal proche de la situation clinique souhaitée est nécessaire car il n'existe pas, à notre connaissance de modèle artificiel mimant cette pathologie.

Ce projet utilisera 16 cochons (50-60kg), modèle qui se rapproche le plus de l'homme en terme d'anatomie cardiaque.

Sous Anesthésie générale, une fuite mitrale sera créée en sectionnant les attaches sous-valvulaires puis le nouveau dispositif de réparation mitrale sera mis en place et la valve sera refixée au moyen d'un néo cordage. Les résultats de la chirurgie seront appréciés au moyen d'une échographie cardiaque pour évaluer s'il y a ou non un résidu de fuite mitrale.

Après chirurgie, l'animal, toujours sous anesthésie générale, sera mis à mort selon les règles éthiques. Toutes les opérations chirurgicales seront réalisées dans des conditions identiques à celles utilisées chez l'homme (anesthésie générale avec analgésie contrôlée). L'animal sera traité avec les mêmes posologies qu'en clinique humaine. Le nombre d'animaux a été minimisé et calculé de façon à obtenir des résultats exploitables.

Nous avons établi des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins et les méthodes utilisées qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique répondent aux exigences du raffinement de la méthodologie.

7840 Comme l'allergie respiratoire, l'allergie oculaire est associée à une hypersensibilité allergique de type immédiat. Elle concerne essentiellement les conjonctivites allergiques bénignes c'est-à-dire la conjonctivite allergique saisonnière et la conjonctivite allergique péri-annuelle. Cette hypersensibilité concerne aussi pour partie les conjonctivites sévères compliquées de kératite comme la kératite conjonctivale vernale et la kératite conjonctivale atopique. Les allergènes responsables sont des pneumos allergènes, aussi responsables de symptômes respiratoires, tels que les acariens ou les pollens ainsi que des trop allergènes comme l'arachide ou le blanc d'œuf.

Ce projet a pour but de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux en permettant d'identifier et de tester l'efficacité de substances thérapeutiques visant à diminuer l'effet des allergènes dans la conjonctivite allergique. Dans ce cadre, nous proposons de mettre en place un protocole de sensibilisation à deux antigènes (l'ovalbumine et le pollen d'ambrosie) chez la souris, le rat ou le cobaye. Dans un second temps, nous testerons différents types de traitements.

Compte tenu des particularités physiologiques et anatomiques de l'organe concerné et l'absence pour l'instant de modèle alternatif, nous devons avoir recours à des animaux pour établir notre modèle. Les informations bibliographiques recueillies, les analyses statistiques ainsi que notre expérience, nous permettront de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés. Plusieurs études sont prévues pour évaluer l'efficacité de traitements. Pour chaque étude, les signes de l'allergie seront mesurés dans les quelques heures après la sensibilisation, au maximum 48 heures après. Les évaluations des signes cliniques se font grâce aux observations en lampe à fente ou autres appareils permettant l'observation de l'œil comme le HRT2 (microscope confocal *in vivo*) qui est sans douleur et non-invasif.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 3600 souris, 1200 rats et 600 cobayes (jeunes adultes). Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. 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.

7841 La cicatrisation cutanée est un phénomène complexe au cours duquel des événements dermiques et épidermiques sont étroitement impliqués. Cette capacité de réparation tissulaire peut être compromise en condition pathologique ou fragilisée et peut conduire à la formation de tissu cicatriciel, qui est souvent vulnérable et instable. Dans un contexte physiologique de plaies étendues (grand brûlé, accidents de la route, exérèse carcinologique...) ou dans un contexte de plaies cutanées pathologiques (plaies du diabétique, escarres, accident radiques, maladies génétiques, etc.) de

nombreuses stratégies ont besoin d'être améliorées et de nouvelles approches sont proposées pour stimuler la cicatrisation, diminuer les complications et diminuer la douleur.

Le projet de recherche a pour objectif de valider de nouvelles approches innovantes, l'apprentissage des personnels de santé, et le développement de nouvelles stratégies pouvant réduire le traumatisme tissulaire, améliorer le diagnostic et pallier une dysfonction de la réparation tissulaire cutanée. Toutes ces questions doivent et seront abordées, directement ou indirectement, sur des modèles animaux pertinents, dans le but de valider la faisabilité, l'innocuité et l'efficacité des thérapies innovantes en réparation cutanée.

Le projet prévoit le recours à des modèles porcins, canins et ovins, justifiés par une taille et une fonction tissulaire proche de ceux de l'Homme, avec un maximum respectivement de 100 porcins, 50 canins et 100 ovins. Le nombre a été évalué et réduit au minimum nécessaire pour répondre aux besoins et objectifs scientifiques des études.

Les modèles animaux suivront exactement le cheminement d'un futur patient avec les mêmes exigences et techniques médicales mises en œuvre pour la réalisation des interventions (personnel hautement qualifié, plateau technique opératoire et d'imagerie de pointe). Afin de réduire au maximum le nombre de modèles, des méthodes d'imagerie non douloureuses permettront de sélectionner au mieux les modèles avant leur entrée en procédure (screening, IRM, scanner / reconstruction 3D. Les procédures expérimentales sont classées légères, modérées et sans réveil. Tous les actes de chirurgies et les mesures de prise en charge complète de la douleur ont été validées par une équipe de vétérinaires afin de garantir le bien-être animal.

7842 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) est une bactérie gram-positive et est fréquemment retrouvée dans le nez, le tractus respiratoire et la peau. Dans certaines conditions, *S. aureus* peut causer un grand nombre de maladies, allant des infections mineures comme des infections superficielles de la peau et des tissus mous jusqu'à des infections mortelles telles que le syndrome de choc toxique, la pneumonie, l'ostéomyélite, la septicémie et l'endocardite infectieuse. C'est toujours actuellement l'une des cinq causes les plus fréquentes d'infections acquises dans les hôpitaux et souvent la cause d'infections postopératoires. Chaque année, environ 750 000 patients dans les hôpitaux de France contractent une infection staphylococcique, soit environ 4 000 décès. Par conséquent, il est crucial de définir les facteurs de risque qui contribuent à l'invasion de l'hôte par *S. aureus*. *Staphylococcus aureus* est l'une des bactéries le plus souvent isolée à partir de prélèvements sanguins de malades. L'incidence annuelle des bactériémies à *S. aureus* (BSA) dans la population générale est évaluée à 28 pour 100 000 en Europe avec un taux de létalité variant de 22 à 26%. Egalement, la BSA est un facteur de mauvais pronostic au cours des pneumonies nosocomiales à *S. aureus* acquises sous ventilation mécanique. Chaque année, environ 750 000 patients dans les hôpitaux de France contractent une infection staphylococcique, soit environ 4 000 décès. L'identification des facteurs de virulence de *S. aureus* favorisant la survenue d'une bactériémie à partir d'un foyer infectieux représente donc une question essentielle en maladies infectieuses. Certains facteurs de virulence entraînent la formation de tunnels au niveau de la barrière endothéliale, contribuant à la dissémination bactérienne, avec un risque de perturbation des fonctions hémostatiques. Nous souhaitons ainsi étudier l'impact de ces facteurs de virulence sur les plaquettes sanguines et leurs fonctions hémostatiques, tout dérèglement de l'hémostase pouvant mener à des troubles hémorragiques parfois mortels.

Remplacer : ce projet nécessite l'utilisation de modèles animaux vertébrés pour mimer la pathologie humaine et pouvoir étudier l'impact des souches bactériennes sur les aspects vasculaires et les conséquences sur la numération sanguine. Nous ferons appel aux souris car c'est un modèle bien caractérisé qui mime parfaitement l'infection humaine à *S. aureus*. Ces souris seront infectées par 4 souches de *S. aureus*, sauvages ou modifiées pour les facteurs de virulence afin d'identifier l'importance de ces facteurs de virulence sur l'invasion des tissus extravasculaires. La BSA et son impact sur le nombre et la fonction des plaquettes sera évalué au cours du temps, jusqu'à 72h après inoculation.

Réduire. Le nombre d'animaux est minimisé pour avoir une approche statistique valable. Nous utiliserons le test ANOVA et le post-test Bonferroni pour analyser les résultats observés après infection par les 4 souches bactériennes. Le nombre d'animaux est minimisé pour avoir une approche

statistique valable. Comme chez l'homme, l'inoculation de *S. aureus* n'entraîne pas systématiquement une bactériémie chez la souris. De ce fait, nous prévoyons un total de 240 souris, qui pourra être réduit à 180 si le nombre de souris développant une bactériémie nous permet d'avoir des résultats statistiquement analysables.

Raffiner : les manipulations ont toujours lieu sur souris anesthésiées maintenues au chaud pour éviter une hypothermie due à l'anesthésie. Durant la durée de l'expérimentation (jusqu'à 72), les souris sont hébergées en cage présentant un environnement enrichi ("cabane" pour se cacher, coton à déchiqueter pour faire le nid,.) et surveillées chaque jour pour déceler tout signe de souffrance éventuel.

7843 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. Comprendre comment elles sont formées est essentiel pour prévenir les hémorragies et pouvoir un jour produire les plaquettes *in vitro*. En particulier, les plaquettes possèdent des granules de sécrétion qui jouent un rôle majeur pour la fonction antihémorragique. Des patients présentant des défauts de biogénèse de ces granules (maladie du pool vide) sont à haut risque d'hémorragies.

Il existe chez le rat un mutant spontané mimant la maladie du pool vide. Dans le cadre d'un projet déjà entamé montrant l'importance de protéines impliquées dans la biogénèse des granules plaquettaires chez la souris, nous souhaitons confirmer la présence ou non de ces mêmes protéines chez le rat normal. Ce projet fera appel à 3 animaux. Nous prélèverons le sang ainsi que différents tissus pour y analyser la présence de nos protéines d'intérêt.

Avantages escomptés : Ce projet permettra de comprendre comment certains constituants des plaquettes sont impliqués dans la formation des granules plaquettaires avec pour perspective clinique à moyen terme de les cibler pour pouvoir stocker dans ces granules des molécules "médicaments" qui pourront être directement délivrés aux sites d'hémorragie après transfusion aux patients.

Remplacer : Pour cette approche, nous devons utiliser des tissus de rat, ainsi que prélever le sang sur l'animal anesthésié afin d'isoler les plaquettes sanguines non activées et déterminer le profil d'expression chez le rat.

Dommages prévus pour les animaux : Le prélèvement de sang se fait sur animal en anesthésie profonde, sans réveil.

Réduire : Le nombre d'animaux est réduit à 3, pour obtenir n=3 prélèvements indépendants.

Raffiner : Le rat est maintenu dans une cage enrichie en jouets et coton à déchiqueter pour son bien-être. Toutes les procédures expérimentales se feront sur l'animal profondément endormi. Le rat sera manipulé avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention.

7844 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au lapin, des études de pharmacocinétique sont requises pour justifier du devenir du médicament dans l'organisme (administration-distribution-métabolisation et élimination, ADME).

L'objectif du projet (protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique, de distribution tissulaire et de métabolisme chez le lapin dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil pharmacocinétique du produit en développement, dans divers tissus, organes et/ou fluides de l'organisme, matrices, évaluer la biodisponibilité du produit et/ou déterminer le temps d'attente pour la sécurité du consommateur. Plusieurs études de pharmacocinétique pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations réglementaires sont obligatoires et indispensables à la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études de pharmacocinétique doivent être conduites dans l'espèce cible.

L'espèce cible est le lapin, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de pharmacocinétique. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (étude de résidu, évaluation de la biodisponibilité ou du profil pharmacocinétique du produit, bioéquivalence) et dans le respect

des textes règlementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 500 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de pharmacocinétique chez le lapin sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement,

- toutes les administrations et prélèvements, et éventuellement les euthanasies, seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont tout changement du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant la pharmacocinétique ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal

- la chronologie des études sera définie de manière à évaluer si des animaux peuvent être réutilisés avant d'entrer dans une dernière étude nécessitant l'abattage des animaux en fin de procédure, dans le but de limiter le nombre d'animaux.

Ce projet couvre également le recueil de sang, d'urine ou de fèces, et de toute matrice dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

7845 La propagation des bactéries multi résistantes et l'absence de nouveaux antibiotiques font courir un risque d'impasse thérapeutique de plus en plus fréquent. Pour faire face à cette situation, l'idée n'est pas de trouver une solution permettant d'éviter l'apparition de résistances, car les bactéries trouveront toujours un moyen de s'adapter. Il convient plutôt de préserver le plus longtemps possible l'efficacité des antibiotiques disponibles ou d'utiliser une molécule permettant d'améliorer leur efficacité.

Le but de notre étude est d'évaluer l'activité *in vivo*, chez la souris neutropénique, d'un booster d'antibiotique associé à un antibiotique de la famille des fluoroquinolones (ciprofloxacine) dans le modèle d'infection de cuisse à différentes bactéries à gram négatif (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pasteurella*).

Pour cela, 459 souris Swiss femelles vont être utilisées.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

Réduction.

Les premiers temps de l'expérimentation consistent à la validation du modèle avec les souches à étudier, ce qui permet d'utiliser le moins d'animaux possible lors de l'évaluation thérapeutique proprement dite.

Pour les évaluations thérapeutiques, le nombre de souris par groupe a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable.

Raffinement.

- Avant l'expérimentation :

Choix des souches : Les souches choisies correspondent aux souches retrouvées lors des infections chez l'homme.

Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans

des cages répondant aux dernières normes. La litière est changée 1 fois par semaine, avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

Détermination des points limites :

- Pendant l'expérimentation :

Soins pré et postopératoires : Les souris reçoivent une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,05mg/kg) 30 minutes avant l'infection. Cette injection est renouvelée 8h après.

Le modèle d'infection de cuisse est réalisé sous anesthésie générale : inhalation continue d'isoflurane 3% débit de gaz frais 0.8L/min.

Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

Euthanasie par dislocation cervicale après pré-anesthésie par inhalation d'isoflurane (3% débit de gaz frais 0.8L/min).

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

7846 Chaque année 1,5 millions d'européens sont victimes d'un traumatisme crânien le plus souvent subit lors d'un accident de la route, d'une chute ou au cours de pratiques sportives. 70 000 personnes perdent la vie des suites du traumatisme et environ 100 000 ne présentent pas de récupération totale et demeurent handicapés, notamment chez les enfants et les jeunes adultes qui représentent une population particulièrement vulnérable en regard de ce type de traumatisme. Bien qu'au cours des dernières années un raffinement des procédures de prise en charge par les urgences et les hôpitaux a permis de réduire la mortalité des traumatisés crâniens, il est apparu qu'un grand nombre de patients souffrent par la suite de désordres centraux chroniques tels que : épilepsie, dépression, démence progressive, etc. À ce jour, aucun traitement ne permet d'empêcher la mise en place de tels désordres à la suite d'un traumatisme crânien.

Le projet que nous souhaitons développer vise à étudier les changements qui se mettent en place à la suite d'un traumatisme crânien au sein de l'unité neurovasculaire (UNV) et qui contribuent aux atteintes comportementales à long terme. En particulier, nous voudrions établir dans quelle mesure les modifications de l'expression des aquaporines sont impliquées dans le processus de neuroinflammation au cours du temps (plusieurs mois/années) après un traumatisme crânien. Le projet s'inscrit dans la compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires des conséquences chroniques d'un traumatisme crânien dans le but de développer des approches thérapeutiques efficaces.

Pour parachever cet objectif, nous nous appuyons sur l'utilisation d'un modèle murin de traumatisme crânien peu invasif, nous permettant d'étudier sur le long court, à l'aide de tests comportementaux et d'outils d'imagerie, les processus de neuroinflammation et de dégénérescence au niveau du système nerveux central avec une définition encore inaccessible chez l'homme. De plus, le modèle murin nous permet de bloquer le processus d'inflammation chronique du système nerveux central après un traumatisme crânien à l'aide de molécules adaptées et ainsi d'envisager le développement de nouveaux traitements.

Le projet respecte et applique les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale. Les procédures expérimentales décrites dans le projet ont un caractère de stricte nécessité et ne peuvent 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 projet concerne 900 souris. Le suivi longitudinal non invasif réalisé en imagerie permet de réduire le nombre de groupes d'animaux utilisés, sans compromettre les objectifs du projet et nous permet un transfert facilité vers la clinique humaine. Finalement, le projet s'appuie sur des méthodologies respectueuses du bien-être des animaux mises en œuvre uniquement par du personnel technique / de recherche formé et qualifié et respecte la règle des 3R. Le bien-être des animaux est un facteur clé de la réussite du projet, pour le garantir, les animaux sont hébergés selon les standards prévus par la réglementation : en groupes sociaux, dans un environnement adapté et enrichi (matériel de nidification, rouleau en carton et barre à ronger). Des points limites en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. De plus, nous réalisons la procédure de traumatisme crânien léger sous anesthésie générale et avons mis en

place une surveillance accrue des animaux après induction du traumatisme afin de réagir et interrompre l'expérimentation si l'animal atteint un point limite.

7847 La résistance aux traitements est un problème clinique majeur, en particulier dans le cas des ostéosarcomes, tumeurs osseuses malignes les plus fréquentes et touchant les patients jeunes (80% sont des enfants ou adolescents). La chimiothérapie est le pivot central du traitement actuel avec des cures avant et après chirurgie. Malgré cela, une proportion importante d'ostéosarcomes sont ou deviennent résistants et les récurrences avec métastases aux poumons ou au cerveau sont fréquentes. Dans ces cas, le taux de survie des patients est estimé à moins de 30% à 5 ans. Ce chiffre n'a pas évolué depuis les années 70 faute de nouvelles stratégies thérapeutiques efficaces. Il est donc absolument nécessaire d'identifier des moyens de contrecarrer la résistance aux traitements afin d'améliorer la survie des patients.

Nous avons démontré qu'une inhibition d'expression d'un gène codant une protéine de détoxification cellulaire (MT2A) permet d'améliorer la réponse de diverses lignées d'ostéosarcome aux chimiothérapies *in vitro*. Une étude pilote a évalué la réponse au cisplatine (contenant un atome métallique) et à la doxorubicine (non métallique et au mécanisme d'action cytotoxique différent). Les résultats indiquent que les deux thérapies sont impactées par MT2A et suggèrent que ce n'est pas dépendant de la présence de platine dans le composé. En clinique, les protocoles de traitement combinent plusieurs chimiothérapies selon l'âge du patient et la réponse au traitement néo adjuvant. Il est indispensable de tester ces chimiothérapies alternatives pour affiner la valeur thérapeutique potentielle du ciblage de notre gène d'intérêt selon le traitement. Le choix des composés à tester chez l'animal est basé sur les protocoles cliniques (seules les thérapies administrées aux patients seront testées). Le présent projet vise ainsi à tester les trois autres chimiothérapies utilisées chez l'enfant (méthotrexate) et chez l'adulte (ifosfamide et étoposide) afin d'avoir un aperçu global de l'impact potentiel de MT2A sur les traitements chez les patients.

Il n'existe pas de méthode alternative possible pour cette évaluation de l'effet anti-tumoral de l'inhibition d'expression de MT2A dans l'ostéosarcome.

En effet, le contexte de l'organisme entier, avec le système immunitaire et le microenvironnement tumoral sont indispensables. De plus, le but est de voir l'effet du traitement sur le processus métastatique (dissémination d'une tumeur à distance dans d'autres sites de l'organisme).

Le modèle animal utilisé et donc le mode d'injection optimal et la durée de l'expérimentation ont été optimisés. L'injection intra-tibiale nécessite une chirurgie invasive et est faiblement reproductible. L'injection sous-cutanée ne permet pas le développement homogène de tumeurs. L'injection intramusculaire permet en revanche le développement de tumeurs et de métastases pulmonaires et a été retenu. Les tumeurs apparaissent au cours de la seconde semaine (détectable lors de la palpation). Nous n'avons pas observé de dégradation de l'état général des animaux avant 6 semaines. Les expériences n'excéderont pas 4 semaines, n'entraînant pas de dégradation détectable de l'état de santé des animaux. Le développement tumoral est suffisamment homogène pour limiter le nombre de souris à 48 pour ce projet. Aucun prélèvement ne sera réalisé durant l'expérimentation. Les tumeurs et organes cibles de métastases seront collectés en fin d'expérimentation pour analyses complètes. Toutes les interventions de type procédures expérimentales seront faites sous anesthésie locale ou générale. Les animaux bénéficieront d'un hébergement en groupes sociaux ainsi que d'un enrichissement environnemental (cocoons, maisons).

7848 Les maladies infectieuses restent aujourd'hui un des principaux enjeux de santé publique. La vaccination a permis de lutter contre de nombreuses maladies, cependant nos connaissances actuelles dans ce domaine sont incomplètes. De meilleures connaissances devraient nous permettre de concevoir de nouveaux vaccins (en particulier contre les pathogènes et maladies qui « résistent » au développement des vaccins comme l'infection par le VIH et le SIDA, l'infection par Plasmodium et la malaria ou l'infection par Mycobacterium tuberculosis et la tuberculose), d'améliorer les vaccins existants, et d'accélérer le développement de nouveaux vaccins contre des maladies émergentes.

Notre projet a pour but d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sollicités dans les premières étapes de la réponse aux vaccins car nous pensons que ces étapes précoces influencent leur innocuité et leur efficacité. Le but ultime est de modéliser les étapes biologiques aboutissant à une

protection contre les pathogènes, depuis l'injection du vaccin jusqu'à l'établissement de la mémoire du système immunitaire.

Aujourd'hui, le virus de la vaccine atténué, le Modified Vaccinia virus Ankara (MVA), non pathogène en lui-même, est couramment utilisé comme vecteur pour des antigènes provenant d'agents pathogènes (VIH, Plasmodium, Mycobacterium...), afin d'induire une protection contre leurs maladies associées.

Pour mener à bien notre projet, l'animal est irremplaçable. La mise en place d'une immunité et son maintien sont complexes et mettent en jeu de nombreux partenaires cellulaires et moléculaires. Aucune méthode alternative *in vitro* ou *in silico* n'existe à ce jour. Le modèle de primates non humains vaccinés avec le MVA est pertinent. La proximité phylogénétique entre l'homme et l'animal, et en particulier les similarités de leurs systèmes immunitaires, font des primates des modèles expérimentaux de choix en immunologie/vaccinologie. Le nombre d'animaux inclus dans ce projet (62) a été réduit au minimum nécessaire pour permettre une analyse statistique robuste des données. Tous sont nés et ont été élevés en captivité dans des établissements agréés.

Les réponses immunitaires seront suivies au niveau du site d'injection du vaccin (peau, tissu sous-cutané, muscle), du ganglion lymphatique drainant ce site et dans le sang. Il est nécessaire de connaître précisément l'interaction entre les différentes cellules et molécules mises en jeu lors de cette réaction immunitaire pour maîtriser les différentes stratégies de vaccination.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration du vaccin et prélèvement de sang et biopsies sous anesthésie, limitation des volumes de sang prélevés). Des critères d'arrêt ont été définis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. Le cas échéant le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider une euthanasie. Les animaux seront hébergés par paires ou 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.

7849 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative progressive, affectant le cerveau et caractérisée par l'apparition de troubles moteurs et cognitifs. Elle résulte de la perte accélérée des cellules nerveuses (les neurones) et de leurs connections (les synapses) au niveau des structures cérébrales telles que le striatum ou la substance noire, impliquées dans le contrôle des mouvements, la coordination motrice ou encore la mémoire. Cette dégénérescence est en grande partie due au peptide alpha-synucléine dans les phases précoces de la maladie. Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif pour cette pathologie.

Pour ce projet, nous voudrions faire la preuve d'efficacité de candidats médicaments (petites molécules, peptides, anticorps, ingrédients alimentaires) dans un modèle préclinique in-vivo (souris) visant à évaluer la force musculaire, la coordination motrice ainsi que les troubles cognitifs. L'étude des effets de composés sur la motricité et la mémoire n'est possible que sur l'animal vivant, le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible. Les tests utilisés (reconnaissance d'objet, mémoire topographique, rotarod) ne sont cependant pas ou très peu aversifs et de très courte durée.

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 impliqués dans les études précliniques (réduction), les candidats médicaments potentiels seront préalablement testés sur des cultures de cellules nerveuses. Seuls les composés ayant montré une efficacité neuroprotectrice *in vitro* seront testés chez l'animal, réduisant ainsi considérablement le nombre d'études, et donc d'animaux, nécessaires. Cependant, nous nous assurerons au préalable que les doses de candidat médicament n'induisent pas d'effets indésirables, rendant alors impossible l'étude d'efficacité, en testant la plus forte dose du composé sur trois souris afin d'évaluer les effets indésirables potentiels. Si l'un de ces animaux venait à montrer un effet indésirable, l'étude d'efficacité ne serait alors pas effectuée.

Les phases précoces de cette pathologie sont modélisées chez la souris C57Bl/6J (lignée classiquement utilisée en neurobiologie) grâce à une injection intracérébrale unique de peptide alpha-synucléine (injection réalisée en conditions aseptiques et sous anesthésie générale). Les animaux

sont traités avec des anti-inflammatoires avant et après chirurgie afin de minimiser la douleur (raffinement). Une fois anesthésiés, ils sont également placés au chaud et surveillés jusqu'à récupération complète. Ainsi, après leur réveil suivant la chirurgie, ces souris ne sont pas dissociables d'une souris normale n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement), ce qui est nécessaire puisqu'un animal souffrant ou stressé ne pourrait effectuer de tests de mémoire ou de motricité. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal ou une inflammation serait observée (qu'elle soit due à l'injection intracérébrale ou au composé), l'animal sera mis à mort immédiatement. Tous les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude. Ce modèle nous permet d'obtenir des réponses rapides et reproductibles quant aux effets neuroprotecteurs des candidats médicaments testés pour le traitement et/ou la prévention de la maladie de Parkinson.

Ce projet de 5 ans nécessite 3300 souris au total pour le test de 50 candidats médicaments. Par rapport aux modèles de souris transgéniques utilisés classiquement dans ce genre d'étude, ce modèle permet une optimisation du nombre de composés testés, donc une réduction du nombre d'animaux, par élimination préalable des composés inactifs ainsi qu'une optimisation du nombre d'animaux par groupes expérimentaux (réduction) tout en permettant d'obtenir un effet statistique. Les animaux seront hébergés en cage collective jusqu'à chirurgie, puis isolés en cage individuelle afin de prévenir le risque élevé de bagarre. Dans les deux cas, les cages contiendront du matériel de nidification ainsi que de l'enrichissement environnemental (raffinement), la durée d'isolement étant réduite au strict minimum.

7850 Le mélanome est la plus grave tumeur cutanée chez l'homme et son incidence est en forte augmentation. En France, 1600 patients porteurs de mélanomes décèdent chaque année. À un stade précoce, le mélanome sous une forme localisée est curable par exérèse chirurgicale. Néanmoins, à un stade avancé, le mélanome est de très mauvais pronostic, car les formes métastatiques sont résistantes aux chimiothérapies. Pendant de nombreuses années, les options thérapeutiques étaient limitées à la chimiothérapie classique qui constituait le traitement de référence, avec des taux de réponse n'excédant pas 10 %. Depuis quelques années, de nombreuses altérations génétiques affectant les voies de signalisation des MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase) et la voie de l'AMP cyclique (AMPc) ont été décrites dans le mélanome cutané, permettant de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. En effet, les essais cliniques de deux inhibiteurs de BRAF, protéine de la voie des MAPK, le Vémurafenib et le Dabrafenib, ont démontré que ces molécules induisent un taux de réponse de 50 %, ce qui est exceptionnel par rapport aux précédentes thérapies. Néanmoins, le problème majeur de ces traitements est l'apparition rapide et fréquente de résistance qui ne permet pas d'obtenir de réponse durable. Afin de palier à ce problème, il semble important de trouver de nouvelles combinaisons thérapeutiques en couplant les inhibiteurs de la voie des MAPK avec des inhibiteurs de protéines impliquées dans d'autres voies de signalisation, telle que la voie de l'AMPc, qui peut être inhibée par les phosphodiesterases (PDE). L'intérêt majeur de ces traitements est de permettre une élimination spécifique des cellules tumorales sans endommager les cellules saines.

Le but de notre projet est d'évaluer l'intérêt des inhibiteurs de PDE dans le traitement des mélanomes. En effet, nos résultats *in vitro* montrent une inhibition significative de la prolifération de lignées de mélanomes humains, lorsque la phosphodiesterase PDE4D est inhibée. Il est maintenant nécessaire de valider que PDE4D peut être utilisée comme une cible thérapeutique à l'aide de modèles précliniques murins (greffes de lignées de mélanomes humains à des souris immunodéficientes Nude). L'utilisation d'un modèle *in vivo* est indispensable afin d'intégrer la plupart des caractéristiques de la pathologie humaine. En effet, un cancer se développant dans ce modèle présente l'ensemble des cibles rationnelles de la maladie cancéreuse avec son hétérogénéité cellulaire, mais également des tissus sains, ainsi que la présence des barrières, qui existent également chez l'homme et qui limitent l'accès du produit à la tumeur.

La prise en compte de la règle des 3R fait partie intégrante de la conception des protocoles expérimentaux de ce projet. L'approche *in vitro* de cette étude a permis en première instance d'établir une preuve du concept, réduisant à son minimum l'utilisation d'un modèle *in vivo* plus complexe que le modèle cellulaire. Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés dans ces études au minimum nécessaire et suffisant pour satisfaire la validité scientifique de l'étude, en particulier au niveau de l'analyse statistique de type ANOVA qui nous permet des comparaisons multiples et de limiter le

nombre d'animaux (utilisation de 160 souris sur 3 ans). Une attention toute particulière sera également portée sur le bien-être des animaux par une surveillance journalière qui sera assurée par le personnel de l'animalerie, en complément de celle des expérimentateurs. Nous veillerons aussi à réduire au minimum (intensité et durée) les souffrances ressenties par les animaux. C'est pourquoi les souris présentant une souffrance et/ou une douleur mise en évidence par une modification comportementale et/ou physique (perte de poids, dos voûté, agressivité) seront euthanasiés selon la méthode réglementaire. Les personnes participant au projet (animaliers ou chercheurs) seront qualifiées et auront suivi une formation adaptée à son niveau de participation aux expérimentations et à sa fonction.

7851 Même si elle n'est pas obligatoire comme chez d'autres animaux d'élevage (moutons et chèvres par exemple), l'identification électronique se met en place chez les canards et les oies. De façon conventionnelle, ces animaux sont identifiés par un numéro unique à l'aide d'une bague disposée à la base de l'aile. Or, cette méthode de numérotation ne permet pas d'identifier un animal sans le manipuler. Avec l'identification électronique, chaque individu est reconnu grâce à une boucle ou une puce électronique lue par un lecteur. Grâce à cette technologie, il est notamment possible de collecter automatiquement des mesures à l'échelle d'un individu élevé en groupe en ferme expérimentale dans des conditions proches des conditions d'élevage conventionnel, sans engendrer de stress d'isolement ou de manipulation. De nombreux outils de mesures, tels que le DAC Palmipèdes (Distributeur Automatique de Concentrés) sont intégrés dans des projets scientifiques de grande ampleur et nécessitent l'utilisation de cette technologie. Jusqu'ici, les canards étaient identifiés, en externe, grâce à une puce disposée à la base du cou et protégée par une gaine en plastique étanche et résistante aux conditions d'élevage. Or, des kystes ont été observés autour du lien nylon. De plus, ce système d'attache n'est pas envisageable chez l'oie, caractérisée par un comportement piqueur. Cette disposition en sous cutanée permettrait donc une amélioration du bien-être animal en éliminant les effets secondaires d'une attache en externe (kystes) et une conservation de l'identification électronique même après abattage des animaux où de nombreuses mesures sont encore réalisées. Ce sont les raisons pour lesquelles une procédure de mise en place de l'identification électronique en sous cutanée chez les canards et les oies utilisés à des fins expérimentales est en cours de développement.

Ainsi, un lot de 10 oies mâles et un lot de 20 canards Pékin soit 10 mâles et 10 femelles seront identifiés à l'aide d'une puce électronique disposée en sous cutanée. Utilisée chez les vétérinaires, cette puce est placée selon la même procédure appliquée en clinique vétérinaire sur les animaux de compagnie. La pose sera faite à l'âge de 10 jours de façon à collecter des données le plus tôt possible dans la vie de l'animal sans risquer de le mettre en danger. Le lieu de pose est différent entre les deux espèces. Du fait d'une croissance et d'une morphologie crânienne différente, la puce est disposée sur le front chez l'oie et le cou chez le canard. Parmi les trois espèces de canards d'élevage, ceux sont les canards Pékin qui ont été choisis car ils sont caractérisés par une peau fine. La réussite de cette procédure sur les canards Pékins assurera sa transposition chez les deux autres espèces de canards d'élevage (canard de Barbarie et mulard) tout en limitant le nombre d'animaux à tester. Ces animaux seront conduits jusqu'à 12 semaines d'âge de façon à vérifier la cicatrisation, l'état général des animaux et la tenue des puces. Après cette date, les animaux seront euthanasiés et la migration de la puce ainsi que sa solidité seront évaluées. Après passage dans la plumeuse, nous serons en mesure de vérifier si la puce est assez solide pour assurer la prise de mesures au moment de la découpe des animaux. Pendant la pose des puces, des conditions d'hygiène et de stérilisation strictes seront respectées pour limiter les infections liées à la pose d'un corps étranger. Pendant leur élevage, aucune procédure provoquant de la douleur ne sera appliquée aux animaux. Ils seront conduits au sol en groupe dans les conditions conventionnelles d'élevage avec des paramètres d'ambiances adaptées, un accès à volonté à l'aliment et à l'eau et un accès à l'extérieur dès l'âge de 5 semaines. Chaque semaine, les animaux seront examinés pour vérifier la présence de la puce grâce à un lecteur et observer l'état général de l'animal notamment au niveau du front et du cou (inflammation, infection, etc.). Une pesée sera également effectuée pour évaluer l'état général des animaux. Les 10 oisons et 20 canetons Pékin impliqués dans ce projet représentent un nombre minimal pour évaluer la tenue, la solidité et la migration de la puce sous la peau mais aussi pour estimer la réaction des animaux à la pose d'un corps étranger. En contrepartie, cette méthodologie validée permettra de limiter la manipulation de ces animaux grégaires et donc de modérer leur stress tout en recueillant des mesures

indispensables aux futurs projets de recherche de grande ampleur appliqués aux productions animales.

7852 Former les participants aux bonnes pratiques en chirurgie en illustrant avec une procédure d'injection intracérébrale chez le rat qui permettra au stagiaire d'acquérir des compétences depuis l'anesthésie de l'animal jusqu'à l'analyse du cerveau. La formation à la chirurgie est nécessaire pour les personnes amenées à pratiquer des actes chirurgicaux sur les animaux utilisés à des fins scientifiques et ces formations doivent être agréées par le ministère de l'agriculture. Afin d'acquérir le geste chirurgical, l'utilisation d'animaux est indispensable.

Cette formation s'adresse à 10 participants et donc afin de respecter la règle des 3R, dans le but de réduire le nombre d'animaux utilisés, les participants manipuleront en binôme. Six rats seront utilisés chaque année (1 par binôme plus 1 pour l'enseignant qui montre le geste chirurgical). Durant la durée du projet, 30 rats seront utilisés. Les rats seront anesthésiés pour la chirurgie et maintenus sur couverture chauffante durant l'anesthésie afin de raffiner la procédure.

7853 En élevage de porc biologique, le sevrage des porcelets demeure, tout comme en élevage conventionnel, une période critique malgré l'âge plus tardif de sevrage (6-8 semaines vs 3-4 semaines en élevage conventionnel) et la plus grande maturité digestive, comportementale et immunitaire des porcelets. Les problèmes observés sont pour la plupart de nature digestive et surviennent durant la période qui entoure le sevrage. Dans ces systèmes, l'absence de synchronisation des chaleurs entraîne des naissances étalées dans le temps. Ces facteurs entraînent une forte hétérogénéité d'âge, de poids et de statut sanitaire des animaux au moment du sevrage. Les conséquences de cette hétérogénéité sont ou peuvent être exacerbées par une alimentation encore peu adaptée au sevrage du fait des contraintes liées au cahier des charges (interdiction d'utilisation des acides aminés de synthèse, ingrédients locaux). Ainsi, l'aliment distribué au sevrage est à teneur élevée en protéines qui ne sont pas toujours très équilibrées et digestibles. Des essais préliminaires ont cependant montré que le désavantage de cette hétérogénéité pouvait être surmonté par la capacité des porcelets à exprimer une croissance compensatrice en présence de fourrages grossiers protéiques (enrubannage de luzerne par exemple). Dans cet essai, nous proposons de décrire et comprendre les mécanismes physiologiques impliqués dans les stratégies d'adaptation des porcelets hétérogènes pour pouvoir ensuite gérer et tirer parti de cette variabilité en élevage en proposant par exemple des stratégies alimentaires adaptées.

Dans cet essai à caractère exploratoire, nous étudierons la variabilité phénotypique (croissance, ingestion, comportement, santé) et physiologique (microbiote, inflammation, immunité, métabolisme) de porcelets issus de types génétiques différents (n=48 issus de 8 truies, 2 petits, 2 moyens, 2 gros par femelle), ayant accès à un aliment 2ème âge dès 10 jours d'âge et à un fourrage grossier riche en protéines après le sevrage. Il s'agit d'établir des classes d'animaux ayant différentes stratégies ou profils d'adaptation/de non adaptation au sevrage et d'explorer les mécanismes biologiques caractérisant ces classes d'animaux.

Pour qualifier physiologiquement (Formules sanguines, métabolites sanguins, stress oxydant, haptoglobine, hormones de régulation du métabolisme et de l'ingestion,.) les porcelets autour de la période d'intérêt (sevrage à 42 jours) nous réaliserons des prélèvements de sang et collectes de fèces sur chaque porcelet.

Nous avons pris en compte la règle des 3Rs,

Remplacer : pour renseigner spécifiquement l'adaptation des porcelets, nous ne pouvons remplacer l'animal

Réduire : nous avons réduit au maximum l'effectif des porcelets (6 x 8 mères) tout en conservant une hétérogénéité, nous limitons les prélèvements sanguins à un par semaine

Raffiner : le cahier des charges biologique impose un enrichissement du milieu de vie des animaux, les porcelets seront élevés sur de grandes surfaces paillées et auront accès à un fourrage grossier. Un suivi rapproché des animaux aura lieu afin de vérifier leur bien-être.

7854 L'objectif du projet est de décrypter l'étiologie d'une pathologie humaine du neuro-développement, caractérisée par une réduction de la taille du cerveau à la naissance, encore appelée microcéphalie primaire humaine. Certaines formes de cette pathologie résultent d'anomalies de la division et/ou de la survie de la population des cellules souches neuronales au cours du développement, qui sont directement responsables de la réduction de la taille du cortex cérébral et des déficits cognitifs associés chez les patients. Cependant, les mécanismes biologiques sous-jacents aux anomalies de la division et de la survie des progéniteurs neuronaux restent à caractériser, et c'est l'objectif de ce projet.

La souris *Mus musculus* est un organisme modèle de choix dans ce contexte. En effet, le développement du cerveau de souris est suffisamment proche de celui de l'homme pour permettre une extrapolation des résultats. De plus, il permet d'évaluer *in vivo* l'impact de modifications génétiques sur le développement d'un cerveau de mammifère. Il reste indispensable pour à la fois modéliser la pathologie humaine de la microcéphalie et pour caractériser les déficits cellulaires responsables.

Dans le contexte de ce projet, 854 individus seront utilisés sur une période de 5 ans. Ce projet nécessitera le recours à une procédure de chirurgie *in utero* et à des injections intra-péritonéales de femelles gestantes, allaitantes et/ou adultes. Nous utiliserons des lignées sauvages et des lignées de souris transgéniques microcéphales déjà caractérisées, qui portent des anomalies cellulaires similaires à celles retrouvées chez les patients. Les embryons microcéphales ne présentent aucune létalité embryonnaire et aucun signe de souffrance avant la naissance. Ils ne seront utilisés qu'aux stades embryonnaires dans nos procédures expérimentales. Afin de réduire le nombre de souris, nous avons eu recours dans un premier temps à des modèles alternatifs, comme la mouche *Drosophila Melanogaster*, les cultures primaires de cellules souches neuronales ou d'explants de cortex cérébral d'embryons de souris *in vitro*. La procédure de chirurgie *in utero* qui sera utilisée restera cependant une étape indispensable pour valider les résultats déjà obtenus *in vitro* dans un contexte physiologique de développement de cerveau de mammifère. En accord avec les recommandations internationales, toutes les procédures expérimentales prévoient une anesthésie et une analgésie adaptée, une surveillance quotidienne des animaux après tout geste expérimental (injection, chirurgie) afin d'assurer leur bien-être et seront arrêtées avant toute souffrance des animaux. Des grilles de score ont été clairement établies pour définir les points limites. Ce projet permettra une avancée considérable d'un point de vue fondamentale dans la caractérisation de l'étiologie de la microcéphalie et des autres pathologies du neuro-développement de manière plus générale.

7855 Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquent chez les hommes et son incidence a fortement augmenté lors de ces dernières décennies. De plus, son incidence et sa mortalité, autant en Guadeloupe qu'en Martinique, y sont plus élevées qu'en France métropolitaine. Un lien a été démontré entre l'exposition à un insecticide organochloré et le cancer de la prostate pour une partie de la population des Antilles. Cet insecticide organochloré fortement rémanent utilisé dans les Antilles françaises de 1973 à 1993 est en effet à l'origine d'une contamination à long-terme du sol, de l'eau et des produits issus de l'agriculture et de la pêche locales.

De par sa fréquence, mais aussi de par la perception de la maladie par la population dans un contexte de pollution environnementale, le cancer de la prostate aux Antilles mérite alors une attention particulière de la part des autorités publiques. L'objectif du projet décrit dans cette saisine sera de compléter les données pharmacologiques concernant l'exposition à l'insecticide et ses effets sur ces tissus cibles, en particulier la prostate. Pour cela, des rats recevront une administration unique par voie orale de l'insecticide radiomarké. Des prélèvements sanguins, d'urine et de fèces seront effectués et les tissus suivant seront prélevés : prostate, cerveau, foie, organes génitaux, reins, tissu adipeux périphérique et tissu adipeux central.

Le recours à des animaux est nécessaire pour obtenir des données tissulaires. L'espèce choisie pour cette étude est le rat car un autre projet du même programme nécessitera l'utilisation d'une souche de rats transgéniques chez qui le développement du cancer de la prostate est favorisé. Un total de 19 rats sera utilisé pour l'ensemble du projet. Une étude préliminaire sera réalisée sur 10 rats répartis en 4 groupes (en fonction des doses et voies d'administration) pour déterminer les temps de

prélèvement de sang, d'urine et de fèces optimaux et la dose d'insecticide radiomarké à administrer pour pouvoir suivre le devenir de l'insecticide dans le sang, l'urine, les fèces et les tissus suffisamment longtemps. L'étude principale sera ensuite réalisée sur 9 rats recevant tous la même dose de l'insecticide (celle choisie grâce à l'étude préliminaire) par voie orale. Dans l'étude préliminaire, il n'y aura que 2 à 4 rats par groupe car il ne s'agira pas de comparer les effets d'un groupe traité par rapport à un groupe contrôle. Cette étude préliminaire aura seulement pour but de compléter les données déjà existantes sur la pharmacocinétique de la molécule. Dans l'étude principale, le nombre de rats sera limité à 9 car l'étude préliminaire aura permis d'établir une dose et des temps de prélèvements de sang, d'urines, de fèces et de tissus optimaux pour établir la toxicocinétique de l'insecticide par voie orale et notamment de limiter le prélèvement des tissus à trois rats répartis sur trois temps de mesure.

Les prélèvements sanguins seront réalisés sur animal vigile grâce à un cathéter placé chirurgicalement dans une des veines fémorales pour l'étude préliminaire (prélèvements rapprochés). Ils seront réalisés sur animal anesthésié par ponction du sinus rétro-orbitaire lors de l'étude principale (prélèvements plus espacés). Les deux méthodes de prélèvement permettront de réaliser plusieurs prélèvements sur le même rat et ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés. Dans les deux études, pour les prélèvements d'urine et de fèces, les rats seront placés en cage à métabolisme pendant une durée n'excédant pas 5 jours pour ne pas infliger une douleur sévère aux animaux. Une mise en place de points limite est effectuée afin de vérifier le bien-être des animaux. Lors de l'étude principale, si des prélèvements d'urine et de fèces sont nécessaires au-delà de 5 jours, les rats seront hébergés dans leurs cages habituelles et les fèces seront alors prélevées directement dans la litière. Le niveau de radioactivité correspondant à la concentration en insecticide radiomarké dans les urines sera déterminé par comptage de la radioactivité de toute la litière ayant absorbée les urines.

7856 La maladie d'Alzheimer (MA) est l'une des maladies neurodégénératives les plus courantes, caractérisée par une perte progressive de mémoire et d'autres fonctions cognitives. A un niveau cellulaire, la MA est définie par une neurodégénérescence de l'hippocampe et des parties spécifiques du cortex (le cortex frontal, temporal, entorhinal et pariétal) avec un dépôt caractéristique de plaques β -amyloïdes et des enchevêtrements de protéine Tau dans le cerveau.

La MA affecte plus de 35 millions de personnes dans le monde et à cause de l'allongement de l'espérance de vie, son nombre devrait tripler en 2050. Ceci crée un besoin urgent de diagnostiquer de manière précoce la MA, ce qui permettra de commencer un traitement dans les premiers stades de la maladie.

Le principal but du projet est d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer dans des modèles expérimentaux, des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre les causes de déficience. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine de ces déficiences (anomalies de la myéline, souffrance axonale) et d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la neuroprotection. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa. Les modèles animaux (souris) développés se font dans le respect des règles de 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (12 animaux par groupe chez APPSWE et seulement 8 animaux chez les souris contrôles C57). Raffiner : les protocoles sont optimisés et les expériences ne sont répétées qu'une fois. Remplacer : les mécanismes biochimiques et moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures de cellules. C'est ainsi que nous avons développés plusieurs types cellulaires en adéquation avec différentes pathologies par exemple les cellules SH-SY5Y comme modèle de la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (8 animaux par condition). Dans ce projet, il n'y a pas de douleur induite sur les souris transgéniques. Par conséquent, le suivi est le même que les animaux sauvages à savoir que lors de toute manifestation douloureuse lorsqu'un animal montre des symptômes une perte de poids significative pendant 2 jours consécutifs (pesée quotidienne et évaluation d'une perte de poids supérieure à 15% pendant plus de 48h consécutives), une léthargie, un mauvais état du poil, une perte d'alimentation, il sera mis à mort avant

la fin de l'expérience. La mise à mort des animaux est réalisée par des méthodes appropriées et autorisées et des personnes expérimentées (niveau II minimum).

Le projet de l'Unité vise la production de connaissances dans le but d'élaborer des stratégies permettant de traiter efficacement cette pathologie. A ce titre, les objectifs du projet scientifique sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des symptômes; d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie; de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux.

Ces objectifs seront obtenus en réalisant les étapes suivantes quels que soient les groupes d'animaux :

- Suivi des aspects cognitifs des animaux par des tests de comportements en présence ou non de substances potentiellement neuroprotectrices;
- Mise à mort des animaux et prélèvement des différents organes pour réaliser les études *in vitro*.

Ce projet repose sur une base solide attestée par plusieurs publications dans des journaux de haut niveau.

L'effectif global pour ce projet sera de 768 souris sur 5 ans.

7857 La daurade royale (*Sparus aurata*) est une espèce côtière de premier plan en Méditerranée française, tant pour l'importance de son exploitation, sa valeur commerciale et son aquaculture, que pour ses aspects emblématiques dans la région. Aujourd'hui concernée par les plans de gestion des petits métiers en Méditerranée, de nombreux aspects de son cycle de vie restent pourtant inconnus, limitant la capacité des scientifiques à fournir un appui aux gestionnaires. Les lagunes méditerranéennes sont particulièrement importantes dans le cycle de vie de cette espèce migratrice mais sa dynamique spatiale en relation avec les caractéristiques de l'habitat reste inconnue.

Ce projet vise à marquer des daurades royales sauvages (N=90) et des loups (*Dicentrarchus Labrax*, N=10) capturées dans un étang à l'aide de

- Marquage externe de type spaghetti (étiquette) = identification individuelle
- Marquage externe de type tatouage = identification individuelle
- Marquage interne (implantation de marques acoustiques de type VEMCO V9) = suivi spatial

L'addition de 10 loups à ce protocole a pour objectif d'observer pour la première fois le comportement spatial de cette espèce et de décider si un projet dédié devra être mis en place à l'avenir pour également améliorer la gestion de cette espèce en méditerranée.

Suite au marquage, les animaux seront remis dans le milieu naturel et suivis pendant 1 an sur le terrain grâce à des stations d'écoutes réparties stratégiquement sur les différents habitats de cette lagune mais également dans les toutes les passes reliant cet étang à la mer ou aux autres étangs.

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

- Remplacer : il est impossible dans le cadre de ce protocole ciblant la Daurade Royale de remplacer cette espèce par un autre modèle, l'intérêt du projet étant justement d'étudier le comportement spatial de cette espèce. De même pour cette première approche sur le loup.
- Réduire : le nombre d'individus testés dans les différents lots et procédures est minimal compte tenu de la nécessité d'avoir des significativités statistiques. En effet, l'étang abrite plusieurs tonnes de daurades chaque année durant la période estivale qui exploitent différents habitats de cette lagune comme site d'alimentation. N=90 a été estimé de manière arbitraire comme le nombre d'individus suivis permettant de capturer l'ensemble des comportements spatiaux possibles pour cette espèce sur un cycle de 1 an.
- Raffiner : Tout a été mis en place dans le cadre des procédures pour limiter la souffrance et le stress des animaux par des procédures d'anesthésie optimales durant les phases pré opératoire, opératoire et post opératoire. Leur capture (la technique de pêche professionnelle reconnu de la capéchade) et la technique de capture la moins traumatisante pour cette espèce.

7858 Depuis plus de 30 ans, la population d'anguille européenne (*Anguilla anguilla*) enregistre un déclin et en 2007, l'espèce a été classée à l'annexe II de la CITES, et en danger critique d'extinction par l'UICN. Au niveau des côtes européennes, les civelles d'anguille remontent les estuaires pour rejoindre les zones de croissance en eau douce, bien que plusieurs études démontrent que certains individus s'installent en estuaire, voire en mer. Le déterminisme des différents patrons de migration n'est toujours pas élucidé et l'enjeu est de taille, puisqu'il est généralement admis que les anguilles migrant en amont tendent à donner des femelles alors que la proportion de mâles est plus importante en aval. Qu'elle soit migrante ou non migrante, la majorité des civelles jeûnent durant leur séjour dans l'estuaire et au niveau de l'estuaire de l'Adour, la reprise alimentaire a lieu vers le mois d'avril quand les civelles atteignent le stade de développement VI A2/VI A3 et que la température de l'eau atteint les 10 °C. Cette phase de reprise alimentaire est cruciale pour la jeune anguille qui remonte les cours d'eau mais également pour celle qui s'installe en estuaire et doit optimiser sa croissance.

Les estuaires sont des zones fortement anthropisées, et les civelles d'anguille peuvent être exposées à différents contaminants dont les effets sur la migration et la reprise alimentaire sont peu ou pas connus. Dans l'estuaire de l'Adour, des concentrations relativement fortes de Methylmercure (MeHg) ont été mesurées, probablement à cause de la présence de bactéries sulfato-réductrices, et une bioaccumulation a été observée dans la faune benthique et l'anguille jaune. Par ailleurs, un effet du MeHg a été mis en évidence sur l'activité de nage des civelles d'anguille. Dans ce projet, nous avons pour objectif d'étudier l'effet de deux concentrations de MeHg sur le potentiel migratoire des civelles (expérience 1) ainsi que sur leur reprise alimentaire et leur comportement interindividuel (expérience 2). En vue d'une expérimentation ultérieure sur les relations entre contamination et autophagie, un test d'efficacité de drogues (TB1 et NH4Cl), modifiant l'activité autophagique, sera effectué sur les civelles (expérience 3). L'activité autophagique est une voie de mobilisation de l'énergie mais également un mécanisme de nettoyage cellulaire. Certains travaux suggèrent un impact de certains contaminants sur cette activité mais également une possible contribution de l'autophagie aux processus de détoxification. Afin d'étudier les relations entre autophagie et contamination, il est essentiel de pouvoir moduler l'activité autophagique. Deux drogues sont classiquement utilisées à ces fins dans la littérature : le TB1 qui active l'autophagie et le NH4Cl qui l'inhibe. Cette expérience préliminaire permettra de tester l'efficacité de ces drogues chez la civelle et de définir les conditions de balnéation (durée, concentration).

De par la particularité du cycle de vie et de la migration estuarienne de l'anguille européenne, l'utilisation pour cette étude d'une autre espèce de poisson est impossible. Ce sont environ 500 individus qui seront utilisés pour les 3 expériences, soit à peu près 125g. Pour limiter au maximum ce nombre, nous utiliserons des techniques de marquage nous permettant de suivre les animaux individuellement. La pêche sera effectuée au tamis à main par nos soins, technique moins traumatisante que le tamis poussé utilisé par la pêche professionnelle. Par ailleurs, notre expertise en physiologie et comportement de la civelle d'anguille (plus de 20 ans d'étude sur ce modèle), nos installations expérimentales dédiées à l'étude du comportement des poissons, des mesures de température et des observations quotidiennes des animaux contribueront à mettre en place des conditions optimales pour les animaux. Les civelles étant lucifuges, la photopériode sera conforme au milieu naturel et l'intensité lumineuse réduite à 10-15lux durant la journée. Les salles thermorégulées assureront une température stable et adaptée à la saison. Les manipulations se feront sous anesthésie légère pour limiter le stress au maximum. Les mesures de consommation d'oxygène seront réalisées pour que le taux d'oxygène dans l'eau ne descende pas en dessous de 80% de saturation, ce qui ne provoque, par expérience, aucun stress chez l'anguille (observable en direct puisque le stress augmente la consommation d'O₂).

7859 L'exposition à des toxiques industriels peut se faire par inhalation mais aussi par contact cutané. L'évaluation du risque d'exposition aux substances chimiques par voie cutanée passe par la caractérisation de leur passage percutané. Deux méthodes complémentaires permettent d'obtenir ces données : les expérimentations *ex vivo*, avec dépôt du toxique sur un échantillon de peau d'origine animale et les expérimentations *in vivo*, pour lesquelles le dépôt est réalisé sur une petite zone de peau de l'animal vivant.

Les études de passage percutané du bisphénol A (BPA) (classé reprotoxique R1B) indiquent que la voie cutanée est une voie potentielle d'exposition à cette substance. Par conséquent, le BPA qui est

présent dans de nombreux produits de la vie courante, tend à être substitué par d'autres composés de la famille des bisphénols pour lesquels on a peu ou pas de données à la fois sur la toxicité et sur le passage percutané. L'objectif du projet est d'évaluer chez le rat, la pénétration percutanée *ex vivo* et *in vivo* de 10 composés de la famille des bisphénols dont le bisphénol S et d'étudier l'éventuelle métabolisation de ces substances lors du passage à travers la peau. Pour garantir une certaine cohérence entre les expérimentations *ex vivo* et *in vivo*, nous avons décidé d'appliquer le même protocole de préparation de la peau avant dépôt de la substance à tester. Ce protocole est issu de la recommandation 427 de l'OCDE s'appliquant aux expérimentations *in vivo*. Concrètement, 24h avant l'expérimentation de passage percutané, le rat sera anesthésié par inhalation d'isoflurane, il sera tondu et sa peau sera nettoyée avec un coton imbibé d'acétone. Dans le cadre des expérimentations *in vivo*, la surface à exposer (3,5 cm²) sera délimitée en collant un anneau en aluminium sur la surface tondu et nettoyée. Le lendemain, dans le cas des expérimentations *ex vivo* (n=60, 6 rats par substance), le rat sera mis à mort par inhalation de CO₂ avant prélèvement de la peau dorsale de l'animal. Chaque substance sera testée à deux doses et avec deux véhicules de dépôt, chaque modalité (1 dose, 1 véhicule) étant réalisée sur 3 disques de peaux provenant d'animaux différents afin de tenir compte de l'éventuelle variabilité inter-individu. Pour les expérimentations *in vivo* (n=100, 10 rats par substance), après dépôt de la substance à tester, les animaux préalablement cathétérisés seront placés dans des cages à métabolisme pour récupérer les urines et les fèces jusqu'à leur mise à mort. La durée de l'exposition sera de 24h. A la fin de l'exposition, l'animal sera anesthésié et la zone de dépôt sera nettoyée. Une partie des rats sera mise à mort à ce stade, tandis que les autres le seront 48h après, pour étudier l'épuration de la substance qui s'est accumulée dans la peau pendant l'exposition. La mise à mort sera effectuée par exsanguination à l'aorte abdominale après anesthésie à l'isoflurane. Chaque substance sera testée à deux doses (5 animaux par dose). Les deux mêmes doses seront utilisées pour les expérimentations percutanées *ex vivo* et *in vivo*. La dose la plus faible devra être le reflet de conditions d'exposition réalistes comme indiqué dans la recommandation 428 de l'OCDE, tandis que la dose la plus élevée devrait permettre de déterminer plus facilement un flux d'absorption à l'équilibre et éventuellement de mettre en évidence un effet de saturation de la peau. En l'absence de données plus pertinentes, pour chaque substance, la dose la plus faible sera basée sur les données de la littérature obtenues pour le bisphénol A. Il est donc prévu de déposer 1 µg/cm². La dose plus élevée pourra être 50 µg/cm².

Les résultats d'excrétion après exposition cutanée *in vivo* apporteront des informations complémentaires à celles obtenues par expérimentation *ex vivo* (toxicocinétique, métabolites produits par l'organisme...) et seront comparés à ceux obtenus après injection par intraveineuse (IV) (voie de référence) de la substance radiomarquée. Pour chaque substance, 5 rats supplémentaires seront donc nécessaires pour les expositions par IV (n=50). En comptant dix animaux surnuméraires pour se familiariser à l'intervention chirurgicale, 220 rats Sprague Dawley mâles sont prévus au total. La mesure du passage percutané *ex vivo* de substances avec de la peau de rat est le modèle le plus largement utilisé pour l'estimation du risque d'exposition percutanée chez l'Homme. Le passage des substances à travers la peau dépend de la complexité de la structure de la peau et celle-ci ne peut pas encore être remplacée par de simples membranes artificielles. La règle des 3R sera appliquée. Réduction : Seules les expériences considérées comme absolument indispensables seront réalisées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles. Raffinement : Les protocoles expérimentaux seront établis en prenant soin de réduire voire supprimer la douleur ou l'angoisse subie par les animaux. Des analgésiques seront utilisés avant, pendant et après la chirurgie de pose de cathéter. De plus, la réalisation dans un premier temps des expérimentations de passage percutané *ex vivo* permettra également de limiter le nombre d'expérimentations sur animal vivant. Le protocole sera arrêté en cas de douleur excessive de l'animal, modification de son comportement (auto mutilation, prostration) ou mauvais état général. Remplacement : Il n'existe pas de données de passage percutané pour ces substances. Ces données et la méthodologie choisie pour les obtenir sont nécessaires dans le cadre de l'évaluation des expositions professionnelles et environnementales afin de contribuer à la préconisation de solutions de prévention adaptées.

7860 La maladie de Wilson est une maladie génétique rare du métabolisme hépatique du cuivre, se traduisant par une accumulation toxique de cuivre au niveau de différents organes, dont le foie et le cerveau, et induisant soit une hépatite aiguë ou chronique, soit des troubles neurologiques et psychiatriques. Le diagnostic est basé sur un faisceau d'arguments cliniques, biologiques, génétiques

et d'imagerie, mais il n'existe à l'heure actuelle aucun marqueur biologique fiable de cette maladie. Pour certains patients, et en particulier ceux qui ont une atteinte purement hépatique, difficile parfois à différencier d'autres causes d'hépatite, ou sont asymptomatiques, le diagnostic peut donc être difficile à poser.

Le cuivre est naturellement présent dans l'organisme sous deux isotopes, le ^{63}Cu et le ^{65}Cu , dont le ratio peut varier sous différentes conditions comme la cirrhose, les cancers colorectaux et du sein, où sa diminution serait prédictive de mortalité, et la maladie de Wilson, où une étude préliminaire sur 5 patients wilsoniens a montré un ratio significativement plus bas que dans la population générale.

L'hypothèse de cette recherche est que le ratio isotopique du cuivre ($^{65}\text{Cu}/^{63}\text{Cu}$) varie chez les patients atteints de troubles hépatiques, de façon distincte entre la maladie de Wilson et les autres hépatopathies. L'objectif de cette étude est donc de confirmer chez le rat que le ratio isotopique du cuivre est bien un marqueur particulier de la maladie de Wilson. Pour cela, nous allons le doser dans le sérum de rats Long Evans Cinnamon, modèle animal spontané de la maladie de Wilson, et de rats atteints de différentes autres causes d'hépatopathie : cholestase (Bile Duct Ligation), stéatose hépatique (CMDD) et fibrose induite (CCL4). Il n'existe pas de méthodes alternatives à ce projet. Cette étude nous permettra d'augmenter les connaissances des marqueurs spécifiques de la maladie de Wilson en vue d'améliorer la performance diagnostique, chez l'humain. L'apparition de douleur ou d'atteinte de l'intégrité physique de l'animal sera déterminée régulièrement par la réalisation d'un score de points limites et engendrera une prise en charge de la douleur, des soins ou une sortie de l'animal de l'expérimentation si besoin.

Afin de répondre à l'utilisation d'une analyse multi variée des paramètres observés, nous avons établis à un nombre de 42 rats maximum nécessaires à cette étude. »

7861 Le syndrome urémique se caractérise par l'accumulation chez les patients insuffisants rénaux de toxines urémiques qui jouent un rôle majeur dans les complications cardiovasculaires et métaboliques associées à l'insuffisance rénale chronique (IRC). Ces toxines urémiques sont principalement issues de la biotransformation de certains acides aminés présents dans les protéines alimentaires (tels que la tyrosine, le tryptophane ou la phénylalanine) par la bactérie intestinale. Ces toxines sont très mal éliminées par l'hémodialyse. Il est donc urgent de trouver des stratégies thérapeutiques pour diminuer la production de ces toxines, stratégies applicables si possible à des patients ne bénéficiant pas encore des techniques de dialyse. Une des stratégies possibles pour diminuer la production des toxines urémiques serait de diminuer l'apport alimentaire des précurseurs de ces toxines tel que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine. Les régimes pauvres en protéines (0.6g/kg/j) sont prescrits en pratique courante chez les patients IRC et ils ont démontré des effets bénéfiques sur la progression de l'IRC. Cependant, ces régimes hypoprotéiques sont régulièrement remis en cause du fait du problème d'observance et des risques élevés de dénutrition. Les mécanismes par lesquels ils agissent sont en outre mal compris. Une hypothèse pourrait être la diminution de certains précurseurs (tels que le tryptophane, la tyrosine et la phénylalanine) des toxines urémiques. Notre hypothèse est qu'une réduction sélective de ces acides aminés serait suffisante pour diminuer notablement la production des toxines urémiques et réduire les comorbidités de la maladie rénale chronique. La modification de « la qualité » plutôt que « la quantité » de protéines pourrait être une stratégie novatrice pour réduire la mortalité associée à l'IRC. Cette étude a pour but d'évaluer le rôle bénéfique de régimes dépourvus seulement de 3 acides aminés (tryptophane, tyrosine et phénylalanine) chez des souris urémiques.

Nous nous proposons d'étudier dans un modèle de souris urémique, induite par un régime alimentaire spécifique, le bénéfice d'un régime alimentaire pauvre uniquement en tryptophane, tyrosine et phénylalanine (Tyr-Trp-Phe) (à des concentrations retrouvées au cours des régimes pauvres en protéines) par rapport à un régime pauvre en protéines (5% de protéines) et à un régime contrôle. Ces régimes seront administrés pendant 5 semaines et l'impact de cette diète sera étudiée sur divers paramètres métabolique, inflammatoires et néphrologiques. Six groupes de 8 souris C57bl6J seront utilisées soit un total de 48 souris (24 souris urémiques et 24 souris contrôle). Une étude *in vivo* permettra de rendre compte de l'ensemble des modifications effectuées par l'insuffisance rénale chronique. Nous espérons observer un bénéfice identique voire supérieur du régime pauvre en tryptophane, tyrosine et phénylalanine sur la production de toxines urémiques et sur les complications

associées à ces toxines (inflammation, insulino-résistance, lésions vasculaires), permettant d'envisager ce type de stratégie nutritionnel chez les patients IRC.

La présente étude est raffinée par l'utilisation d'un modèle non chirurgical pour induire l'IRC qui ne s'accompagne d'aucune douleur ou détresse pour les animaux à comparaison du modèle chirurgical traditionnel de néphrectomie. Cette technique évite ainsi d'avoir recours à une chirurgie pour induire une insuffisance rénale chronique (technique classique de néphrectomie des 5/6 nécessitant deux interventions chirurgicales) et permet de supprimer la mortalité et la douleur post-opératoire.

7862 L'exposition aux pesticides impacte aussi bien les agriculteurs que les consommateurs. Ils sont présents dans l'environnement et les aliments. Dans cette étude, nous focalisons notre attention sur les effets sur la santé d'un des fongicides les plus utilisés en France et très controversé, l'époxiconazole. Utilisé largement sur les cultures céréalières, son autorisation est sujette à débat due à ses méfaits sur la reproduction des mammifères et ses propriétés de perturbateurs endocriniens (PE). Le but de cette étude est d'apporter des éléments sur deux notions émergentes et essentielles de l'action des PE, leur caractère obésogène et la transmissibilité aux générations de leurs effets néfastes et des modes d'action sous-jacents. Ce dernier point soulève une forte inquiétude car il met en exergue la dangerosité, pour la population générale, de substances chimiques au-delà même de leur interdiction. L'étude sera réalisée chez la souris C57Bl/6 couramment utilisée pour ce type de projet et fournissant un recul scientifique et une quantité de données bibliographiques importantes. Le projet nécessite également l'analyse des deux sexes de par la nature de la molécule étudiée qui est un PE et des modifications physiologiques attendues qui sont étroitement liées au sexe de l'individu (obésité, analyse des organes génitaux). La règle des 3R a été également prise en compte dans l'élaboration de la démarche expérimentale. « Réduire » : Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, nous avons établi par rapport à la bibliographie qu'un effectif de 12 animaux par lot permet une puissance statistique suffisante. A chaque génération, des animaux des deux sexes seront croisés pour obtenir la génération suivante. Au total près de 642 souris seront utilisées dont 432 vont suivre la procédure expérimentale et 210 vont permettre d'obtenir les générations suivantes. Les souris restantes vont être utilisées pour l'obtention des générations suivantes. Le projet nécessite deux groupes témoins (négatif et positif) et le suivi des animaux sur trois générations. Les animaux seront divisés en 12 lots (pour chaque génération) suivant leur sexe, leur exposition et l'utilisation d'un régime hyperlipidique ou non. Ce régime permet d'induire une obésité et d'exacerber l'effet obésogène de la molécule le cas échéant. « Remplacement » : Cette étude nécessitant une exposition par voie orale et une étude multi-organe, le recours au modèle animal est indispensable. « Raffinement » : Les animaux seront surveillés quotidiennement avec un examen plus approfondi une fois par semaine lors de la mesure de leur poids corporel. Des enrichissements seront utilisés sous la forme d'ajout d'igloo en carton ou de plaque de cellulose. Les animaux seront également plusieurs par cage pour éviter le stress dû à un isolement.

7863 L'induction d'une péritonite chez la souris est l'un des modèles qui imite le mieux le développement de la septicémie chez l'homme. La septicémie est une réponse inflammatoire généralisée grave de l'organisme suite à une infection. Lors de choc septique, forme la plus grave de la septicémie, il existe une défaillance généralisée des organes pouvant entraîner le décès. Dans le monde, une personne meurt de choc septique toutes les 3-4 secondes et dans les pays industrialisés, le choc septique représente autant de décès que l'infarctus du myocarde. Le choc septique est une inflammation généralisée due à une production importante de médiateurs inflammatoires par les cellules intervenant dans la défense de l'organisme (cellules immunitaires). Les cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux (ASCs) ou de la moelle osseuse (BM-MSCs) représentent un nouvel espoir thérapeutique pour la septicémie. En effet, l'injection intraveineuse d'ASCs chez des souris avec un choc septique sévère diminue l'état d'inflammation général, inhibe l'infiltration de cellules inflammatoires dans différents tissus ainsi que la production de cytokines pro-inflammatoires, augmentant ainsi la survie des souris.

L'étude de l'effet immunomodulateur des différentes populations d'ASCs ou de BM-MSCs a été démontrée *in vitro* mais il est indispensable de confirmer ces résultats *in vivo*, en ayant une vraie situation d'inflammation mettant en jeu l'ensemble des partenaires cellulaires qui interviennent lors de l'inflammation. Nous nous intéresserons donc à l'effet de ces différentes populations cellulaires sur la

résolution de la péritonite induite chez la souris. Pour cette étude, 8830 souris seront utilisées. Pour l'ensemble des protocoles, nous avons déterminé le nombre de souris minimal nécessaire pour obtenir des résultats significatifs. Des conditions optimales d'expérimentation seront appliquées afin de limiter au maximum la souffrance de l'animal et afin de préserver son bien-être. Ainsi, les animaux seront élevés à 5 animaux par cage sur portoir ventilé afin de maintenir leur état grégaire. Du papier type kleenex sera ajouté dans la cage afin d'enrichir l'environnement de vie des animaux et de permettre la formation de leur nid. Afin de diminuer la douleur un antalgique type Tramadol sera placé dans l'eau de boisson des animaux vingt-quatre heures avant l'intervention puis de manière continue après la chirurgie. De plus, afin de faciliter l'accès à la nourriture et à l'eau, l'alimentation sera disposée directement dans la cage et l'eau sera fournie sous forme d'éponges imbibées placées également directement dans la cage mais également dans des biberons. Les animaux seront observés deux fois par jours à la recherche des signes indicatifs de douleur tel qu'une posture anormale ou des difficultés de ventilation et des troubles de comportement de type automutilation. L'évolution de la cicatrisation sera également regardée. Les animaux seront gardés de 1 à 10 jours maximum selon les procédures expérimentales. Au moindre signe de dégradation de l'animal, ce dernier sera euthanasié. Afin d'éviter la répétition de l'expérience, nous aurons 5 animaux par groupe et l'expérience sera répétée trois fois afin de permettre une analyse statistique fiable.

7864 L'incontinence urinaire est un trouble urologique défini par une perte accidentelle ou involontaire d'urine. Elle se manifeste sous plusieurs formes (incontinence urinaire d'effort, incontinence urinaire par urgences mictionnelles ou par hyperactivité vésicale, incontinence urinaire mixte combinant les deux premiers types d'incontinence) et touche un large public, pas uniquement constitué de personnes âgées. Avec plus de 3 millions de français concernés, l'incontinence urinaire représente un véritable enjeu en matière de santé publique.

Cependant, afin de comprendre les causes de l'incontinence urinaire, il est nécessaire de connaître l'appareil urinaire, constitué des reins, des uretères, de la vessie et de l'urètre. En condition physiologique normale, le fonctionnement du tractus urinaire se décompose en deux phases :

Une phase de remplissage, pendant laquelle l'urine secrétée en continue par les reins s'accumule progressivement dans la vessie, restant étanche grâce au sphincter urétral (interne et externe) assurant par ses contractions la continence urinaire.

Une phase de vidange ou miction. Chez l'Homme adulte, le déclenchement de l'évacuation de l'urine se fait consciemment par différents mécanismes intervenant simultanément et de manière coordonnée entre la vessie et le sphincter urétral (relâchement du sphincter urétral et contraction du muscle de la vessie, le détrusor).

L'objectif de cette étude est d'évaluer l'effet de candidats médicaments sur la fonction vésicale et/ou sur le fonctionnement du sphincter urétral dans des conditions physiologiques et / ou pathologiques telle que l'hyperactivité vésicale induite par l'instillation intra-vésicale d'acide acétique dilué chez le rat ou le cobaye anesthésié. Le choix de l'espèce dépendra de la fonction étudiée et de la cible pharmacologique visée par le candidat médicament.

Actuellement, les méthodes alternatives *in vitro* et *ex vivo* permettant une évaluation de la fonction vésicale et/ou urétrale dans son ensemble n'existent pas ; c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est nécessaire pour comprendre et traiter l'incontinence urinaire.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans les conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Un suivi journalier des animaux sera effectué par les zootechniciens y compris les week-ends. Si au cours de la période d'hébergement, les animaux présentaient un comportement atypique (agressivité, prostration, isolement, blessures externes), ils seraient placés en cage individuelle.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 600 rats et de 500 cobayes en raison de 10 rats et 8 cobayes inclus par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Nous avons établi une stratégie d'expérimentation nous permettant 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).

7865 Durant le développement embryonnaire, une cellule souche pluripotente va pouvoir se différencier en un état cellulaire mature et spécialisé. La vision de cet état différencié comme étant irréversible a été largement remise en cause ces dernières années, notamment grâce à des travaux démontrant la possibilité de reprogrammer une cellule différenciée en une cellule souche embryonnaire-like grâce à un cocktail de facteurs de pluripotence (Oct4, Sox2, Klf4 et cMyc). Le processus de reprogrammation implique une dédifférenciation et une réacquisition de plasticité pour la cellule. Ces 2 caractéristiques sont également impliquées dans l'initiation cancéreuse, au cours de laquelle les mutations de gènes régulateurs conduisent à une perte d'identité cellulaire et à une réacquisition de plasticité cellulaire. En accord avec ces observations, il a récemment été montré que l'expression transitoire des 4 facteurs de pluripotence *in vivo* conduisait au développement de tératomes dans divers tissus laissant supposer des mécanismes initiateurs communs aux reprogrammations pluripotente et oncogénique. Au contraire, une étude récente montre que l'expression cyclique des 4 facteurs de pluripotence (2 jours d'induction suivis de 5 jours de « récupération ») chez des souris modèles de vieillissement précoce améliorait le phénotype associé à l'âge et la survie de ces souris, sans induire la formation de tératomes. C'est dans ce contexte que nous proposons d'étudier de manière similaire les effets d'une expression forcée transitoire ou cyclique des 4 facteurs de pluripotence sur la formation tumorale dépendante de Ras. Nous avons déjà des données préliminaires *in vitro* nous laissant supposer que l'induction cyclique d'un programme pluripotent pourrait affecter négativement la tumorigénèse.

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

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

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

Les effectifs définis dans ce protocole ont été déterminés grâce au comportement connu de ces modèles expérimentaux et tiennent compte des exigences statistiques nécessaires à l'exploitation des résultats.

4- Nombre total d'animaux inclus dans ce projet

132 souris seront utilisées pour réaliser ce projet.

7866 80% des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique (ADKP) développent une cachexie, un syndrome dévastateur impliquant une fonte du muscle et du tissu adipeux.

La perte de masse musculaire altère non seulement la qualité de vie des malades, leur réponse aux traitements, leur survie mais elle est aussi un moteur du développement tumoral. Aucun traitement approuvé n'est cependant disponible pour limiter cette fonte musculaire délétère. La compréhension de cette perte de masse musculaire représente un réel enjeu clinique.

Les cellules tumorales et le système immunitaire secrètent des substances solubles circulantes appelées cytokines qui vont à la fois avoir une action sur la croissance de la tumeur et induire en parallèle une atteinte musculaire. Notre projet vise à comprendre l'action d'une ces cytokines sur le muscle et comment l'atteinte musculaire induite va en retour influencer la progression de la tumeur. Dans ce but, nous avons développé un modèle de souris génétiquement modifiées exprimant dans le muscle squelettique un gène modifié en lien avec la signalisation cellulaire de la cytokine étudiée. Ce modèle de souris présente une perte de masse musculaire récapitulant celle observée dans les modèles de cachexie. Nous souhaitons évaluer l'impact de cette fonte musculaire sur la progression d'une tumeur pancréatique implantée chez ces animaux. Cette implantation sera faite par injection de cellules d'adénocarcinome pancréatique murin soit sous la peau (sous-cutané) soit directement au

niveau du pancréas par injection guidée par échographie afin d'évaluer l'impact de l'environnement tumoral.

Cette approche est particulièrement innovante puisqu'elle adresse la problématique du dialogue entre la tumeur et le muscle (dans les deux sens) et permettra de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans la fonte musculaire induite par le cancer et comment cette fonte musculaire influence la progression de la tumeur. L'objectif final est d'identifier de nouvelles cibles moléculaires intéressantes pour le développement de nouveaux traitements.

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

Réduction : Nous utiliserons le nombre d'animaux minimal permettant d'obtenir des résultats statistiquement interprétables. Afin de réduire le nombre de souris utilisées dans cette étude nous réaliserons un suivi non invasif du développement de la tumeur par échographie HD.

Raffinement : un personnel qualifié s'assure du bien-être des animaux au quotidien. Une surveillance attentive quotidienne des animaux sera réalisée. L'expérimentation ne sera pas poursuivie au-delà de l'apparition de signes évocateurs de mal-être ou de souffrance animale définis au préalable. Afin de réduire la souffrance animale par une chirurgie invasive, la greffe orthotopique sera réalisée par injection avec guidage échographique.

Nombre d'animaux : Au total, 252 souris seront utilisées.

7867 La fistule anastomotique est la présence d'une fuite entre la cavité interne du colon et l'abdomen. Elle représente la plus importante complication et cause de mortalité après résection colorectale chez l'homme. Elle touche des patients opérés pour cancer du côlon, du rectum ou maladies chroniques inflammatoires de l'intestin. Les fistules engendrent souvent des ré-interventions avec un suivi particulièrement onéreux et contraignant. Ce projet vise à réduire le taux de fistules anastomotiques avec un implant résorbable innovant qui assure un renfort dynamique et favorise une régénération tissulaire solide et pérenne de la paroi colorectale avec un design adapté aux protocoles opératoires actuels.

Dans ce but, des études de sélection *in vitro* ont été réalisées pour fabriquer et sélectionner des implants dont les caractéristiques sont compatibles avec une implantation colorectale (résistance, maniabilité,). Cette première étape de sélection a permis de réduire le nombre d'animaux avec une approche de remplacement (dégradation *in vitro*) et de définir les implants les plus prometteurs (R de remplacer). Cette étape étant désormais terminée, ce projet a pour objectif de suivre la résorption de l'implant en condition réel d'application au niveau colorectale.

Différentes études seront menées au cours de ce projet pour atteindre cet objectif avec une étude de faisabilité et deux études principales. Le nombre maximum d'animaux (50 par étude) pourra être réduit en fonction du nombre de produits à tester. Le nombre total d'animaux utilisé sera donc au maximum de 150 lapins.

Afin de répondre à cet objectif le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'interaction d'un organisme vivant entier avec ce nouveau dispositif médical. En effet le comportement du dispositif se modifie avec le pH de l'organisme et les mouvements de l'intestin. La réponse immunitaire peut également influencer la dégradation du dispositif et sa performance dans la réduction des fistules.

Cette espèce animale (lapin), couramment utilisé en expérimentation animale, a été décrite dans la littérature scientifique sur des modèles de fistules colorectales et permettra d'une part de gérer plus facilement son bien être au cours de l'étude et d'autre part de travailler sur des lots homogènes afin de limiter la variabilité de réponse (âge et sexe fixés).

Afin de suivre le devenir de l'implant au niveau colorectal, l'imagerie médicale et notamment l'imagerie scanner sera utilisée. C'est une technique non invasive et non douloureuse qui requiert seulement une légère anesthésie des animaux durant l'examen. D'un point de vue éthique, elle permet de diminuer le nombre d'animaux nécessaire car les animaux pourront être conservés au long de l'étude (R de Réduire).

Des critères d'interruption ou points limites seront définis afin de prévenir toute forme de souffrance des animaux. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires le plus rapidement possible avec les traitements adaptés (R de raffiner). Lors des chirurgies qui consiste en la résection d'une partie basse du rectum et la mise en place de l'implant au moment de la suture, un suivi post-opératoire sera effectué sur chaque animal en vérifiant son état de bien-être et de santé, et en lui administrant des traitements ou soins locaux adaptés. Pour l'ensemble de ces chirurgies une analgésie et antibiothérapie sera administré avec une période de soins et d'attentions cliniques postopératoires réalisée afin de détecter tout signe clinique anormal, non reprise du transit, anorexie et ainsi prendre les mesures nécessaires rapidement et de façon adéquate.

Ce projet permettra de valider la dégradation et l'efficacité de ce nouveau dispositif médical (ou DM) et de sélectionner les prototypes pour une demande de mise sur le marché d'un nouveau dispositif médical.

7868 Les cellules NK (Natural Killer) sont des lymphocytes de l'immunité innée connus pour leur rôle au cours des réponses anti-tumorales. Ces cellules sont en effet capables de reconnaître et d'éliminer les cellules tumorales grâce à des récepteurs membranaires. Cependant, la stimulation chronique de ces récepteurs par les cellules tumorales conduit à l'épuisement des cellules NK, c'est à dire à la perte de leur fonction. Cette situation explique que de nombreuses tumeurs échappent au contrôle exercé par les cellules NK. Restaurer la fonction des NK et ainsi leur contrôle sur la tumeur, est donc un objectif de portée thérapeutique. Cela nécessite au préalable de connaître les mécanismes présidant à l'induction de l'épuisement ainsi que les voies altérées dans les cellules épuisées afin de pouvoir les contrecarrer et identifier de potentielles cibles thérapeutiques. Ce type de projet nécessite l'utilisation de modèles animaux, le nombre d'acteurs cellulaires et moléculaires mis en jeu étant trop nombreux et leurs interactions trop complexes pour pouvoir être modélisés *in vitro*. Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles. Afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés (200 souris), des techniques de pointe permettant la mesure précise de l'activation des voies de signalisation dans les cellules (cytométrie en flux multiparamétrique, Immunohistologie par fluorescence) seront utilisés. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

7869 Récemment, une famille de molécules à potentiel antalgique a été développée, les inhibiteurs d'enkephalines. En effet les opioïdes endogènes comme les enképhalines ont un effet antalgique limité du fait de leur dégradation rapide par les enzymes (enkephalines) alors que la morphine (exogène) présente un effet analgésique puissant mais pourvu de nombreux effets secondaires (constipation nausées et surtout dépression respiratoire) qui limite son usage. Ainsi, cibler les enképhalines peut constituer un moyen efficace et à moindre risque pour traiter la douleur. Divers modèles de douleur aiguë, inflammatoire, neuropathique (hypersensibilité à la douleur) etc... ont montré leur sensibilité à ce type d'inhibiteur chez le rongeur sans révéler d'effets secondaires.

La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements proposés ont une efficacité limitée, surtout au stade chronique de la maladie. Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Nous proposons pour ce projet d'évaluer les effets d'un inhibiteur d'enkephalinase (IEnk) dans un modèle de migraine par donneur de monoxyde d'azote (NO) chez le rat.

Chez le rat male, nous testerons l'hypersensibilité cutanée faciale développée à la suite d'injections intrapéritonéales (i.p) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg), connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche aussi chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales du passage au stade chronique de la migraine est l'hypersensibilité à la douleur mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets d'IEnk sur la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique (retrait de la face) de rats soumis à 1 (stade aigu) ou 5 injections répétées (stade persistant) d'ISDN. Pour ce projet et afin de respecter la règle

des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN. L'effet de IEnk sera testé à la suite d'une injection intraveineuse (iv) et comparé au groupe témoin (sérum physiologique) correspondant et à un contrôle positif correspondant à l'injection d'un antimigraineux de référence, le sumatriptan. De plus, dans l'optique d'une application clinique potentielle du produit, l'effet dose (2) d'IEnk sera évalué après administration per os (orale) et comparé au groupe témoin correspondant.

Six groupes de rats seront utilisés dans la condition stade aigu :

- 1 groupe témoin IV (injection de sérum physiologique iv + 1 injection ISDN ip)
- 1 groupe test IEnk IV (injection IEnk 20mg/kg iv + 1 injection ISDN ip)
- 1 groupe témoin positif IV (injection sumatriptan 300µg/kg (anti-migraineux de ref) + 1 injection ISDN ip)
- 1 groupe témoin per os (injection de sérum physiologique po+ 1 injection ISDN ip)
- 2 groupes test IEnk per os effet 2 doses (injection IEnk po 50mg/kg + injection ISDN ip ; injection IEnk po 100mg/kg + injection ISDN ip)

Six groupes de rats seront utilisés dans la condition stade persistant :

- 1 groupe témoin IV(injection de sérum physiologique iv + 5 injections ISDN ip)
- 1 groupe test IEnk IV (injection IEnk 20mg/kg iv + 5 injections ISDN ip)
- 1 groupe témoin positif IV (injection sumatriptan (anti-migraineux de ref) + 5 injections ISDN ip)
- 1 groupe témoin per os (injection de sérum physiologique po+ 5 injections ISDN ip)
- 2 groupes test IEnk per os effet 2 doses (injection IEnk po 50mg/kg + 5 injections ISDN ip ; injection IEnk po 100mg/kg + 5 injections ISDN ip)

Dans la première condition, les animaux seront testés à la suite d'une seule injection d'ISDN et dans la 2ème suite à 5 injections d'ISDN répétées (1/jour). Au total 120 animaux seront utilisés dans ce projet. Le recours à l'animal vivant pour le projet est justifié par le fait que l'étude des effets antalgiques de l'agent pharmacologique en vue d'un développement clinique potentiel ne peut être réalisé que sur un animal conscient. Le nombre d'animaux par groupes et du nombre de groupes est réduit au maximum tout en permettant une discrimination des effets antalgiques potentiels.

Sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association for the study of pain puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie mettra fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique. Tous les animaux (2 conditions) seront mis à mort à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique.

Par ce projet, nous entendons caractériser chez le rat si le IEnk possède un pouvoir antalgique efficace dans la douleur (allodynie) migraineuse aussi bien au stade aigu que chronique.

7870 La iontophorèse est une méthode qui permet d'administrer un médicament à travers la peau sous l'effet d'un courant de faible intensité. La iontophorèse peut être une voie alternative aux traitements oraux lorsqu'une concentration élevée d'un médicament est nécessaire localement mais qui, administrée en systémique (Intraveineux), engendre des effets secondaires néfastes. Dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des ulcères cutanés, la iontophorèse de molécules capables d'améliorer la fonction vasculaire et la cicatrisation au niveau de la zone atteinte, pourrait constituer

une alternative aux traitements oraux, en particulier si ces derniers sont responsables d'effets indésirables (hypotension, maux de tête...). Ce projet est une étude de tolérance, de preuve de concept et de mise au point de modèles pour évaluer le potentiel thérapeutique d'un médicament sur la cicatrisation en contexte pathologique type diabète. En effet une hyperglycémie chronique induit des altérations structurales et fonctionnelles à l'origine d'une des complications bien connues du diabétique : l'ulcère diabétique. Cette complication en fait la première cause d'amputation non traumatique des membres inférieurs. Nous évaluerons l'efficacité de l'administration par iontophorèse d'une molécule favorisant la cicatrisation (analogue de la prostacycline) sur 2 modèles d'ulcère (par excision et ischémique) sur 2 modèles murins : BKS et PTGIR. Le modèle BKS est un modèle murin couramment utilisé dans les études de cicatrisation diabétique tandis que le modèle PTGIR possède une délétion au gène codant pour les récepteurs IP (Prostaglandin I2 receptor), impliqué dans la cicatrisation. Nous souhaitons, par l'utilisation spécifique de cette altération génétique, observer l'implication, que nous supposons principale, de la voie des prostacyclines dans la cicatrisation par l'administration de Tréprostinil par iontophorèse. Comme le passage d'une molécule à travers la peau dépend de nombreux paramètres à la fois liés au courant, à la molécule concernée et à la structure de la peau, il est par conséquent très difficile de savoir si une molécule peut être administrée sans expérimentation sur un modèle animal. Nous avons choisi de travailler sur la souris car pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle autre (cellules cultivées, peau de synthèse, simulation informatique). L'effectif des animaux utilisés, 166 souris, et a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendus mais également en tenant compte du risque de perte d'animaux. Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être, nous utiliserons une grille d'évaluation de la douleur adaptée au comportement de l'animal et l'utilisation d'analgésique sera prévue pour soulager la souffrance.

7871 Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez les femmes européennes. Parmi les différents types de tumeurs mammaires, celles surexprimant le récepteur HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) sont associées à un phénotype clinique agressif et un pronostic défavorable. Ces dernières années, l'introduction de nouveaux traitements à base d'anticorps anti-HER2 tels que le trastuzumab (Herceptin®) et le conjugué anticorps-cytotoxique (ADC) trastuzumab-emtansine (T-DM1, Kadcyla®) a considérablement amélioré la survie globale des patientes. Un ADC résulte du greffage d'un agent cytotoxique puissant sur un anticorps thérapeutique (mAb) via un bras espaceur convenablement construit (linker). Cependant, le T-DM1 se présente comme un mélange hétérogène d'immunoconjugués, ce qui compromet sa fenêtre thérapeutique. De plus, une résistance acquise au T-DM1 est fréquemment observée. Il est donc urgent d'avoir accès à de nouvelles thérapies plus efficaces.

Après avoir validé *in vitro* leur efficacité accrue par rapport au T-DM1, le projet proposé vise à évaluer l'efficacité *in vivo* de nouveaux ADC optimisés. Des protocoles d'imagerie seront prévues afin d'effectuer des études de stabilité, biodistribution et pharmacocinétiques de nos ADC préalablement marquées. Ces techniques d'imagerie permettront d'effectuer une validation préclinique à visées thérapeutiques tout en étudiant les mécanismes d'actions impliqués dans l'organisme. Les modalités d'imagerie utilisées seront le tomographe avec détection par fluorescence et la bioluminescence.

Les protocoles proposés répondent à la règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer). Ainsi, le nombre d'animaux nécessaires a été calculé de façon à apporter des réponses statistiquement fiables tout en évitant des mises à mort inutiles (398 souris au total). Ce choix de l'animal est nécessaire pour réaliser la validation préclinique thérapeutiques et les études de pharmacocinétiques, stabilité et biodistribution de nos immunoconjugués. L'ensemble des systèmes d'imagerie sont complémentaires et non invasifs. Par ailleurs, la douleur et l'angoisse causées aux animaux seront évaluées et réduites à chaque fois que cela sera possible. Nous avons défini des points limite précoces afin de prévenir toute apparition de douleurs au-delà desquels les animaux seront mis à mort.

7872 Les infections respiratoires communes atteignent la population par épidémies annuelles saisonnières. Dans les régions à climat tempéré, ces épidémies surviennent principalement en hiver. Souvent, il s'agit d'un épisode étiqueté "grippal" mais le virus de la grippe n'est pas le seul à pouvoir donner un tel tableau. Une notion de "coup de froid" est souvent évoquée peu de temps avant l'apparition des symptômes. Dans un certain nombre de cas, une surinfection bactérienne prend le relais alors que les

signes d'infection virale disparaissent. Le lien entre l'épisode viral et la surinfection bactérienne n'est pas bien compris. Parfois, l'infection est d'emblée due à une bactérie. Chez certains sujets comme aux âges extrêmes de la vie ou en cas de maladie respiratoire préexistante comme l'asthme, la surinfection bactérienne rhinopharyngée ou bronchique peut évoluer vers une pneumopathie responsable de détresse respiratoire aiguë et parfois du décès. Les efforts de santé publique ciblent actuellement la prévention des infections virales par la vaccination des sujets à risque mais tous les virus en cause ne sont pas accessibles à une vaccination. Une meilleure connaissance du lien entre le froid, l'infection virale et la surinfection bactérienne permettrait d'élargir les moyens de protection des populations.

Le but de ce projet est d'évaluer, chez la souris, l'impact d'un environnement froid sur le microbiote respiratoire et le développement d'une infection respiratoire virale.

Sur la base que la diversité de ce microbiote respiratoire est un des éléments de protection de l'organisme vis-à-vis des agents pathogènes, nous émettons l'hypothèse que l'inhalation d'air froid modifie la composition du microbiote respiratoire, favorisant ainsi l'infection virale secondaire.

Afin de tester cette hypothèse, nous utiliserons un modèle de souris en raison des facilités de manipulation de cette espèce en milieu de confinement de classe microbiologique 3 et en raison du fait qu'il existe des modèles de grippe murine validés et largement documentés.

Ce projet sera réalisé dans un laboratoire de sécurité microbiologique de classe 3. Les animaux seront infectés par aérosolisation dans une chambre d'exposition du corps entier. Les souris seront ensuite hébergées en cage de plexiglas de 5 animaux placés dans l'isolateur prévu à cet effet.

Ce projet mettra en œuvre des méthodes très peu invasives afin de réduire l'angoisse des animaux. L'exposition à l'aérosol est non irritante, les souris ne seront pas contraintes mais placées dans un panier grillagé où elles seront libres de se déplacer durant l'aérosolisation qui dure 1 heure. Il n'est pas attendu de douleur ni souffrance durant l'aérosolisation ni durant le développement de l'infection virale. Un stress modéré est attendu pendant l'exposition au froid.

Quatre groupes seront comparés :

- Groupe "Témoins" (n=10) : exposition à la T° ambiante du laboratoire, soit environ 22°C.
- Groupe "Froid" (n=10) : exposition à la température de 4°C pendant 2 heures
- Groupe "Grippe" (n=10) : exposition à un aérosol infectieux contenant un virus de la grippe A H1N1 dans une chambre d'aérosolisation corps entier, exposition à une température ambiante de 22°
- Groupe "Grippe et Froid" (n=10) : exposition à la température de 4°C pendant 2 heures puis exposition à un aérosol infectieux contenant un virus de la grippe A H1N1 dans une chambre d'aérosolisation corps entier.

Tous les prélèvements pour analyse seront effectués en post mortem immédiat, après euthanasie par inhalation d'un anesthésique général puis exsanguination par ponction intracardiaque.

Selon le principe dit de réduction, nous utiliserons le plus petit nombre d'animaux permettant de mettre en évidence une différence significative entre les groupes, afin de réduire le nombre d'animaux utilisés. Comme nous le décrirons par la suite, il ne nous paraît pas possible de remplacer un modèle animal par un modèle *in vitro* pour l'étude du microbiote.

Nous prélèverons pour chaque souris : une aspiration nasopharyngée, un lavage bronchoalvéolaire, le bloc trachée - poumon, ainsi que le sang total de l'animal et sa rate.

Le projet nécessitera 40 animaux. Le critère d'évaluation principal sera le nombre d'animaux développant une pneumonie grippale.

7873 Les maladies cardiovasculaires sont à l'origine de près de 150 000 décès chaque année en France. Les artères périphériques permettent une régulation fine des débits sanguins et une perfusion optimale des tissus. La dysfonction vasculaire entraîne un défaut de perfusion des organes (cœur, cerveau, reins) liée à un problème vasomoteur (tonus excessif, dysfonction endothéliale), une rigidification (fibrose, calcification) et à des événements thrombotiques. Ces mécanismes contribuent aux complications vasculaires liées à l'hypertension, l'insuffisance cardiaque ou le diabète. La caractérisation des déterminants impliqués dans le contrôle de la réactivité et du remodelage

vasculaire ainsi que de la thrombose permettrait d'envisager de nouvelles thérapies pour lutter contre les pathologies vasculaires.

Les nucléotides extracellulaires, comme l'ATP, sont des molécules libérées dans le système vasculaire en réponse à des stress mécaniques, hypoxique ou inflammatoires. Ces molécules entraînent la constriction des artères et également des effets à plus long terme sur la prolifération et la migration cellulaire et l'agrégation des plaquettes sanguines. L'hydrolyse de l'ATP génère de l'adénosine une molécule aux nombreux effets biologiques (anti-inflammatoire, dilatatrice, anti-thrombotique), ainsi que du pyrophosphate, un anti-calcifiant physiologique.

Ce projet vise à mettre en évidence un rôle joué par l'ATP et ces produits dérivés dans les atteintes artérielles associées notamment au Pseudoxanthome Élastique (PXE), une maladie rare, et des artériopathies connexes. Pour cela nous disposons de lignée de souris transgéniques modifiées pour les différents éléments de cette signalisation.

La souris est un bon modèle pour la maladie humaine, car l'organisation de son ADN et l'expression de ses gènes sont très similaires à celles de l'homme. L'ensemble de ces investigations représente un total de 448 souris. Cette étude se fera dans le respect de la règle des 3 R de manière à assurer une Réduction des animaux utilisés le Raffinement des techniques opératoires d'analgésie et d'euthanasie ainsi que le Remplacement le cas échéant par des techniques *in vitro*. Pour les animaux provenant d'un fournisseur extérieur, une période d'acclimatation de 7 jours minimum sera respectée. Cette période permettra aux animaux de se rétablir du stress associé au transport et de s'acclimater à leur nouvel environnement. Pour les souris élevées dans notre animalerie, les conditions d'hébergement sont conventionnelles avec contrôle de la température, l'éclairage et un libre accès à l'alimentation et la boisson. Chaque animal sera manipulé régulièrement et calmement afin de le familiariser à la manipulation humaine et de ne pas l'effrayer ou l'exciter. Le nombre d'animaux est réduit au maximum pour obtenir des données exploitables en prenant en considération le nombre de souris qui pourraient être perdues durant les protocoles. Les prélèvements biologiques seront réalisés dans l'ensemble des groupes pour une exploitation optimale de chaque souris/traitement. Le test statistique prévu est le test ANOVA.

7874 L'objectif de ce projet est de montrer qu'il est possible de réguler (inhiber), *in vivo*, de façon efficace et réversible, l'expression d'une protéine d'étude par des inhibiteurs de protéase. La mise au point d'un tel système pouvant induire l'inhibition de l'expression de protéine de façon rapide, efficace et réversible par des molécules validées en thérapeutiques (inhibiteurs de protéases) pourra être appliquée directement dans tous les domaines scientifiques impliquant l'étude de la fonction d'une protéine d'intérêt, incluant la cancérologie. La réalisation de ce projet est en conformité avec les exigences de réduction du nombre des animaux en recherche. En effet, outre le fait que la validation *in vitro* du système étudié a permis de préciser un certain nombre de détail expérimentaux, l'étude de la cinétique de l'inhibition sera effectuée en grande partie sans douleur ou mise à mort d'animaux puisqu'elle impliquera l'imagerie optique sous anesthésie. Cela permettra de limiter de façon significative le nombre de souris d'intérêt en suivant la même souris au cours du temps. Un nombre de 76 souris (tout génotype confondu) est estimé pour la réalisation de ce projet.

L'option de suivre les animaux par imagerie de fluorescence *in vivo* apparaît donc comme une stratégie adaptée au respect de la règle des 3 R de l'éthique dans l'expérimentation animale (Réduire, Remplacer, Raffiner). Cette technologie permet notamment de réduire considérablement le nombre des animaux utilisés (suivi longitudinal sans mise à mort) et de raffiner les protocoles (absence de douleur, meilleur suivi, étude fonctionnelle...).

7875 L'administration de bactéries en provenance du tube digestif du patient pourrait être une solution pour améliorer la qualité de vie de malades traités pour des leucémies myéloïdes ou certains troubles ostéo-articulaires. La solution la plus simple serait de pouvoir administrer ces bactéries sous la forme d'une gélule avalée par le malade. La gélule permettrait alors de délivrer les bactéries intactes au niveau du colon en protégeant les bactéries des sucs de l'estomac et de l'intestin grêle. Ceci nécessite de développer une gélule intelligente et d'étudier les conditions optimales d'emploi de celle-ci. L'objectif de l'étude est d'évaluer, chez le porc pris comme modèle de l'homme, le transit de ce dispositif et la façon dont ce dernier libère la substance qu'il transporte au niveau du tube digestif. La

méthode retenue est la gamma scintigraphie externe reconnue comme la méthode standard d'investigation minimalement invasive. L'utilisation de cette méthode couplée à une imagerie scannographique elle-même minimalement invasive vise à réduire au minimum l'inconfort de l'animal. Cette mesure ne peut être réalisée en vivo car les digesteurs artificiels sont actuellement limités pour modéliser le transit de ce type de dispositif. Le projet utilise 8 porcs de 30 kg et évaluera deux dispositifs différents par leur densité.

7876 Les ulcères cutanés représentent un véritable problème de santé publique. Souvent associés à des douleurs, ils sont particulièrement handicapants et ont un impact très négatif sur la qualité de vie des patients. Les patients atteints de sclérodémie systémique, une maladie rare, présentent des ulcères au niveau des doigts dans près de 20% des cas et les traitements existants sont rares, peu efficaces et entraînent souvent d'importants effets secondaires.

La iontophorèse est une méthode qui permet d'administrer un médicament à travers la peau sous l'effet d'un courant de faible intensité. La iontophorèse peut être une voie alternative aux traitements oraux lorsqu'une concentration élevée d'un médicament est nécessaire localement. Dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des ulcères, la iontophorèse de molécules susceptibles d'améliorer la cicatrisation au niveau de la zone atteinte pourrait constituer une alternative aux traitements oraux, en particulier lorsque ces derniers sont responsables d'effets secondaires.

Le passage d'une molécule à travers la peau dépend de nombreux paramètres : l'intensité du courant, la structure de la molécule elle-même et à la qualité de la peau. Il est très difficile de savoir si une molécule peut être administrée chez l'homme sans expérimentation préalable sur un modèle animal. Les molécules préalablement sélectionnées seront testées sur deux modèles animaux différents. Le premier est un modèle de souris qui présentent une peau de structure anormale et le second est un modèle de souris avec une peau qui présentent un défaut de circulation sanguine. Ces modèles ont été choisis car ils sont complémentaires et nous permettront de nous rapprocher au plus près des conditions pathologiques rencontrées chez les patients sclérodermiques.

Les ulcères ne se développent pas spontanément sur ce type de modèles animaux. Aussi, il nous faudra les réaliser nous-même. Nous développerons deux techniques différentes d'ulcérations. La première se fera mécaniquement par découpage d'une petite section circulaire de peau et la seconde technique se fera par compression de la peau à l'aide d'aimants.

Ce projet est une étude de mise au point de modèles animal pour évaluer le potentiel thérapeutique de plusieurs médicaments sur la cicatrisation sur différents modèles animaux.

Nous avons choisi de travailler sur la souris car pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal par un modèle non vivant (cellules cultivées, peau de synthèse ou encore simulation informatique).

L'effectif des animaux utilisés est d'environ 120 rats pour évaluer l'efficacité et l'innocuité des 5 molécules envisagée (sous conditions que toutes les molécules donnent des résultats positifs) et de 1716 souris. Cet effectif a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendus mais également en tenant compte du risque de perte d'animaux.

Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être, nous utiliserons une grille d'évaluation de la douleur adaptée au comportement de l'animal et l'utilisation d'analgésique sera prévue pour soulager la souffrance.

7877 A l'heure actuelle, on pense que les pathologies neurodevelopmentales telles que l'autisme ou l'épilepsie sont dues en partie à des facteurs génétiques mais il reste encore à les caractériser et à préciser leurs rôles. Pour mieux comprendre les mécanismes moléculaires associés aux troubles du développement du cerveau caractéristique de ces pathologies, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine l'utilisation de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène impliquée dans les troubles du développement cérébral chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Le cerveau est composé d'un ensemble de circuits neuronaux précis et complexes reliant de grands ensembles de neurones. Lors du développement, les neurones acquièrent très tôt des caractéristiques moléculaires et anatomiques distinctes. Ces dernières années nous avons identifiés

un gène candidat : le gène Vangl2. Ces gènes sont exprimés dans le cerveau des mammifères et nous soumettons ici l'hypothèse que Vangl2 contrôle le développement des circuits de neurones au cours de la formation du cerveau, et participe à l'âge adulte au bon fonctionnement du cerveau.

Règle des 3R.

Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études « in-vitro » sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour limiter au maximum leur utilisation.

Raffiner : Pour supprimer l'angoisse, la détresse ou la douleur subie par les animaux au cours de l'expérience, les animaux sont élevés en cage collective enrichie et des points limites suffisamment précoces ont été mis en place.

Réduire : Pour n'utiliser que le nombre minimal d'animaux tout en garantissant la validité scientifique et statistique des résultats, nous considérons qu'un nombre minimum de 8 animaux est nécessaire pour chaque condition expérimentale. Nous utiliserons dans ce projet deux lignées de souris transgéniques dont une à quatre stades de développement. Notre projet portera donc sur 20 lots de souris et nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à ce projet à 160 souris sur 5 ans.

7878 Dans le système nerveux central, les neurones communiquent entre eux en libérant des neurotransmetteurs au niveau de structures appelées synapses, dans lesquelles on trouve des récepteurs spécifiques de ces neurotransmetteurs. Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire dans le cerveau. La mobilité de certains récepteurs du glutamate joue un rôle important dans la formation de la mémoire et ses perturbations pourraient être impliquées dans les troubles psychotiques. Pour mimer ces perturbations de mobilité, nous allons injecter chez de jeunes rats, dans l'hippocampe, une région du cerveau impliquée dans la formation de la mémoire et détériorée chez les schizophrènes, différentes molécules capables de moduler cette mobilité (anticorps, nanoparticules, peptides compétiteurs, agents pharmacologiques, virus). Ces injections auront lieu entre le 8ème et le 14ème jour post-natal, une période critique du développement cérébral où s'établissent les connexions entre neurones. Quand ces animaux auront 2 mois, au stade où devraient apparaître d'éventuels symptômes pathologiques, nous allons évaluer les conséquences de ces modulations de mobilité par un test comportemental qui permet de détecter des altérations des capacités cérébrales symptomatiques de la schizophrénie. Le cerveau de ces animaux sera ensuite prélevé après leur mise à mort pour étudier en électrophysiologie et en imagerie l'impact des changements de mobilité des récepteurs au glutamate sur le fonctionnement des réseaux de neurones. A titre de contrôle, les mêmes expériences seront reproduites sur un groupe d'animaux ayant reçu une injection de solution saline, et sur un groupe d'animaux non opérés. Dans le respect du R de réduire de la règle des 3R, si nous privilégions le plus souvent possible des méthodes alternatives, notre projet ici étudiant des mécanismes mnésiques nous ne pouvons pas nous passer de l'animal dans sa totalité. Dans le respect du R de réduire la solidité des statistiques nécessite des groupes de 12 animaux pour le test comportemental mis en œuvre pour détecter les perturbations de mobilité des récepteurs. Au total, 12 lots de 12 animaux seront nécessaires à la réalisation du projet, soit un total de 144 animaux. Dans le respect du R de raffiner, toutes les douleurs consécutives à la chirurgie seront soulagées à l'aide des molécules les plus adaptées au protocole et à l'état des animaux. Des points limites suffisamment prédictifs seront définis pour réduire la souffrance tout au long de la vie de l'animal. Nos rongeurs sont maintenus en hébergement collectif dans un milieu enrichi.

7879 Maîtriser la perte des protéines lors d'atrophies musculaires intenses (pathologiques ou physiologiques) par le biais de leur synthèse et/ou de leur dégradation est un des objectifs majeurs de notre laboratoire.

La protéolyse, et plus particulièrement le système protéolytique protéasome dépendant (UPS), est souvent la composante majeure de la fonte protéique musculaire. Le protéasome contrôle finement l'activité de nombreuses protéines cellulaires (facteurs de transcriptions, cyclines,.) qui sont tout d'abord "marquées" par une chaîne de polyubiquitine (conjugués ubiquitinés) puis dégradées par le protéasome 26S. Le processus de marquage résulte de l'action séquentielle de trois enzymes : une

enzyme d'activation, E1, une enzyme de conjugaison, E2, et une ubiquitine ligase E3. Il existe une E1 pour 35 E2 et plusieurs centaines d'E3 chez l'homme, une E2 pouvant travailler avec plusieurs E3 et vice versa. De nombreuses études suggèrent un rôle majeur du système ubiquitine-protéasome dépendant (UPS) dans la dégradation des protéines musculaires.

Une enzyme E3 spécifique du muscle squelettique (MuRF1) impliquée dans le ciblage des protéines à dégrader par le protéasome est directement liée à l'atrophie musculaire au cours d'états cataboliques variés (dénervation, immobilisation, apesanteur simulée, diabète, cancer), ce qui fait de MuRF1 un acteur central de la dégradation des protéines contractiles. Cependant, bien que les enzymes E3 soient responsables de la sélection du substrat, ce sont généralement les enzymes E2 qui portent l'activité catalytique. L'identification des enzymes E2s impliquées dans l'atrophie musculaire est donc un prérequis pour pouvoir envisager de lutter efficacement contre la perte de muscle squelettique au cours de différentes pathologies.

Ce système UPS étant particulièrement complexe, nous avons effectué ces dernières années de nombreuses études sur des cellules en cultures ou *in vitro* qui nous ont permis, sans utiliser d'animaux, d'identifier 5 enzymes E2s fonctionnant avec MuRF1. Nous avons pu démontrer que ces couples MuRF1-E2 étaient tous capables de dégrader la téléthonine, une petite protéine dont l'absence est liée à l'apparition d'une myopathie. Ces études sont directement à relier au respect de la règle des 3R en accord avec la réglementation européenne 2010/63/UE, (1) en effectuant des essais sur cellules en culture pour restreindre le champ d'investigation à 2 E2, (2) en utilisant la technique la plus sensible et efficace pour détecter un effet bénéfique de l'invalidation et (3) en utilisant les muscles des 2 pattes. Ceci permet de réduire le nombre d'animaux à utiliser pour les expériences (n=190).

Cependant, il est obligatoire de valider ces résultats dans un "vrai" muscle sur modèle animal. Nos études seront donc focalisées sur l'impact des couples E2-MuRF1 identifiés sur le métabolisme de la téléthonine dans des muscles de souris soumis à un état catabolique (traitement à la dexaméthasone), c'est à dire une situation engendrant une perte de muscle. La dexaméthasone est un glucocorticoïde utilisé couramment en médecine humaine. Ces études seront effectuées par invalidations partielles ou surexpressions d'enzymes par électrolocation. Cette approche est particulièrement efficace et n'entraîne aucun effet secondaire détectable sur les animaux.

7880 La cryptosporidiose est due à un parasite protozoaire, *Cryptosporidium parvum*, qui est un agent pathogène responsable d'entérites diarrhéiques. C'est une maladie zoonotique (transmissible de l'animal à l'homme et vice-versa) d'importance majeure, de par son impact médical, économique et sociétal. La cryptosporidiose touche particulièrement les jeunes ruminants, et est responsable de diarrhées néonatales, provoquant ainsi des retards de croissance, et des mortalités qui peuvent atteindre les 100% dans certains élevages. Par conséquent, la recherche d'une thérapeutique basée sur l'utilisation des produits naturels est une stratégie dont l'objectif est double : D'une part, elle pourrait limiter les pertes économiques dans les élevages de ruminants, tout en limitant la transmission zoonotique de *Cryptosporidium* à l'Homme ; et d'autre part, elle pourrait constituer une alternative à l'utilisation des antibiotiques, limitant ainsi considérablement les « antibiorésistances ». Le présent projet sera réalisé sur 3 années et vise à évaluer l'efficacité de 4 molécules naturelles contre la cryptosporidiose.

Nous avons choisi de travailler sur 24 chevreaux (mâles et femelles) de la race française Alpine pour chaque essai (molécule à tester). Les animaux sont utilisés à la fois pour confirmer les résultats *in vitro* et parce qu'ils constituent la future cible du traitement (les jeunes ruminants en général) contre la cryptosporidiose. C'est le modèle le plus utilisé pour tester des traitements destinés aux ruminants contre la cryptosporidiose. Les chevreaux seront infectés expérimentalement par voie orale avec la forme infectante du parasite (des oocystes achetés). Ils seront ensuite séparés en 3 lots différents de 8 chevreaux : Lot 1 témoin infecté (les chevreaux ne recevront aucun traitement), Lot 2 (traitement préventif 4 heures avant l'infection), Lot 3 (traitement curatif après l'infection dès la détection des premiers oocystes dans les fèces). Les animaux sont suivis quotidiennement pendant 30 jours (d'âge des chevreaux). L'excrétion des parasites par les animaux sera quantifiée à partir d'un prélèvement fécal. Nous attendons une réduction précoce du taux des parasites excrétés dans les lots infectés et traités, avec moins de symptômes (diarrhée, déshydratation et perte de poids).

Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en permettant d'avoir des résultats interprétables et fiables : une étude statistique a été faite auparavant afin d'ajuster au minimum le nombre de 8 animaux par lot, et donc au minimum 24 chevreaux seront utilisés pour tester chaque produit, ce qui contribue considérablement à la réduction du nombre des animaux à utiliser. La règle de « Raffinement » a été prise en considération dans ce projet : 1). Les animaux seront répartis par lots de 8 individus dans des pièces dédiées ce qui leur permet de se retrouver en liberté dans des groupes sociaux. Cet espace largement suffisant permet aux animaux d'exprimer un large répertoire de comportements normaux. 2). Les zootechniciens passent quotidiennement afin de faciliter la socialisation des animaux et de prélever les fèces dans de bonnes conditions. Une attention particulière sera prise en considération les premiers jours à l'entraînement des chevreaux à l'allaitement artificiel. 3). Les expériences seront réalisées par des personnes expérimentées et qualifiées afin d'éviter toutes fausses manipulations ou un éventuel stress pour les animaux. 4). Si les animaux perdent plus de 10 % du poids normal ou s'ils présentent des diarrhées sanguinolentes pendant plus de 48 heures, un traitement adapté leur sera administré.

Ce projet vise à tester l'activité « anti-cryptosporidienne » de 4 molécules, ce qui nécessitera au maximum 96 chevreaux (issus de 48 femelles) pour toute la durée du projet (3 ans).

7881 La vaccination chez le poisson est essentielle pour maîtriser l'impact écologique de l'industrie halieutique, dans une optique de développement durable. Alors que les vaccins à ADN ont montré leur efficacité, ils présentent un risque d'intégration génomique et de propagation du caractère OGM aux populations sauvages qui freine leur développement. De plus, leur mode d'administration par voie intramusculaire est contraignant et non applicable aux alevins. En réponse à cela, ce projet contribuera à développer des vaccins à ARNm administrables par voie muqueuse. Plus précisément, ce projet identifiera des formulations et modes d'administration vaccinale efficaces, pour l'expression d'acides nucléiques modèles chez le poisson zèbre. Ce projet doit être réalisé sur un organisme modèle entier, avec un système immunitaire adaptatif et une immunité muqueuse bien développée, ce qui exclut les approches *in vitro* et les organismes modèles non Vertébrés.

Le nombre maximum envisagé de poissons utilisés dans les procédures expérimentales est de 264 poissons-zèbre. Il sera réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétables. Les points limites sont fixés afin de réduire la souffrance des animaux (absence de signes généraux évocateurs de mal-être).

7882 Les lymphomes T périphériques (PTCL) sont des néoplasies hétérogènes qui représentent environ 12% de l'ensemble des lymphomes chez l'Homme. Ces pathologies sont souvent considérées comme des « maladies orphelines », reflétant ainsi les difficultés rencontrées pour leur classification, diagnostic et traitement. Il a été montré une augmentation du risque de développer un PTCL chez les femmes ayant des implants mammaires, suggérant un lien entre PTCL et implants mammaires. De plus une étude récente montre qu'un biofilm bactérien spécifique présent sur l'implant est associé à la présence du PTCL au sein de la capsule fibreuse entourant l'implant. En plus du rôle inflammatoire des bactéries, plusieurs études suggèrent un rôle inflammatoire de l'enveloppe des implants mammaires et/ou du silicone présent dans les implants mammaires. L'ensemble (enveloppe/silicone/bactéries) pourrait entraîner des stimulations antigéniques chroniques des lymphocytes T présents au niveau de la capsule autour de l'implant. Cette étude sera réalisée grâce à un modèle murin de PTCL dans lequel la stimulation antigénique chronique semble être essentiel à la transformation des lymphocytes T.

Cette étude permettra de mesurer l'impact de ces implants associant un biofilm bactérien sur la cinétique et le spectre des lymphomes T obtenus dans le modèle murin. Les PTCL sont des pathologies pour lesquels nous n'avons pour le moment pas de traitement efficace. Il faut donc développer des outils afin de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies pour pouvoir mieux les traiter. Nous ne disposons malheureusement pas ou trop peu de lignées cellulaires permettant ces études, il faut donc développer de nouveaux modèles animaux. Pour cela la souris est très utile car nous disposons de modèles génétiquement modifiés tels que les souris p53 KO permettant le développement plus rapide et une pénétrance plus importante de ces pathologies. Des points limites ont été définis afin de prévenir des signes de souffrance des animaux. Le nombre de

souris par groupe a été réduit au maximum sans mettre en péril une interprétation statistique de nos résultats.

Au total nous aurons besoin de 275 souris pour cette étude.

7883 Les chauves-souris qui sont présentes sur tous les continents à l'exception de l'Antarctique, représentent le quart des espèces de mammifères. On dénombre en Europe 52 espèces répertoriées, toutes intégralement protégées, dont 34 en France métropolitaine.

Les chauves-souris hébergent un certain nombre de microorganismes dont certains importants en santé publique, les mieux connus étant les virus de la rage.

La rage, maladie très ancienne est causée par un Lyssavirus, qui appartient à la famille Rhabdoviridae. Parmi 15 espèces de Lyssavirus actuellement référencées par l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), 13 ont été isolées chez les chauves-souris. Cinq espèces de Lyssavirus circulent chez les chauves-souris en Europe : EBLV-1, EBLV-2, BBLV, WCBV et LLEBV, ces cinq différentes espèces ayant toutes été isolés chez des chauves-souris d'espèces différentes.

La surveillance passive de la rage des chauves-souris en France métropolitaine, par la collecte et l'analyse des cadavres, montre la circulation de 3 espèces virales : EBLV-1 (76 cas reportés sur des chauves-souris), BBLV (2 cas) et LLEBV (1 cas).

L'étude propose d'estimer la circulation du lyssavirus EBLV-1 dans deux colonies de chauves-souris, dans lesquelles un ou des individu(s) ont été découverts infectés par le virus EBLV-1.

L'étude consiste à capturer temporairement, la nuit, à plusieurs reprises, des chauves-souris lorsqu'elles quittent la colonie au moyen de pièges spécifiques. Durant tout le temps de la capture, les animaux sont placés ensemble dans une enceinte prévue à cet effet, afin de diminuer le stress lié à la capture et de limiter au maximum la baisse de leur température corporelle. La veille de chaque capture, le comptage des animaux lors des sorties des gîtes est effectué afin d'estimer le nombre d'individus présents dans la colonie et ainsi d'ajuster le nombre maximal d'animaux à capturer. Une capture peut varier de 1 heure à 4 heures, selon la taille de la colonie.

Chaque animal sera identifié par pose de bague ou de puce électronique, et subira une prise de sang et un prélèvement de salive par session de piégeage avant d'être relâché sur son lieu de capture. Le temps de manipulation de la chauve-souris n'excède pas en moyenne 15 minutes. Tous les animaux seront bagués ou identifiés s'ils possèdent déjà une bague, pesés, mesurés et sexés par un chiroptérologue vacciné à titre préventif contre la rage et qui accompagne chaque session de capture afin de s'assurer qu'un minimum de dérangement est provoqué.

Ce projet de suivi de deux colonies, entraînera au maximum la capture, la manipulation et le relâcher de 360 animaux.

7884 Le Virus Respiratoire Syncytial humain (VRS) est l'un des agents pathogènes respiratoires humains les plus importants, responsable d'infections pulmonaires. L'inoculation du virus s'effectue par voie respiratoire, après inhalation de gouttelettes provenant des voies aériennes supérieures (générées par la toux, éternuements ou la parole) d'un sujet infecté ou après contact avec des objets souillés par des sécrétions respiratoires infectées. Le VRS est un problème majeur de santé publique. Il serait responsable chaque année dans le monde de 33,8 millions d'infections respiratoires basses, 3,4 millions d'hospitalisations et d'au moins 66 000 morts chez les enfants de moins de 5 ans. En France, le VRS serait responsable chaque année de 15 à 20 000 hospitalisations d'enfants de moins de 5 ans. A côté des infections pédiatriques, le VRS touche aussi les adultes, avec une symptomatologie modérée pour les personnes sans pathologie sous-jacente. Responsable chez le nourrisson de la bronchiolite, il est également à l'origine d'une morbi-mortalité notable chez les personnes âgées, les sujets immunodéprimés et les patients souffrant d'affection respiratoire ou cardiaque.

A ce jour, il n'existe aucun traitement curatif contre l'infection par le VRS. Les modalités prophylactiques de l'infection se limitent à l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre la protéine de fusion du VRS. Cependant, ces traitements sont réservés aux nourrissons prématurés ou atteints d'une affection broncho-pulmonaire ou cardiaque. L'arsenal thérapeutique est, quant à lui, limité à un antiviral à large spectre présentant des effets toxiques, y compris pour le personnel

soignant. La mise au point d'un vaccin protégeant contre l'infection par le VRS est reconnue comme une priorité mondiale par l'Organisation Mondiale de la Santé. C'est pour cette raison qu'il est nécessaire d'évaluer l'efficacité de candidats vaccins dans un système immunitaire mature afin de prévenir l'infection par le VRS.

Pour valider l'efficacité de nouvelles thérapies anti-infectieuses avant de les tester chez l'Homme, il est nécessaire de les évaluer dans un modèle proche de l'Homme. Les modèles animaux sont essentiels pour comprendre la transmission et la pathogénèse du VRS et pour évaluer des candidats vaccins et seules les espèces Primates (dont l'Homme) sont sensibles au VRS. L'infection de macaques cynomolgus par le VRS a déjà été réalisée dans le cadre d'essais vaccinaux et aucun signe clinique anormal n'a été observé. Dans un premier temps, la mise au point d'un modèle d'infection par le VRS sera réalisée puis l'immuno-efficacité de candidats vaccins sera évaluée dans ce même modèle. Pour cela, des lavages broncho-alvéolaires et nasaux seront réalisés afin de doser le virus dans les sécrétions de mucus. En parallèle, des prélèvements sanguins seront réalisés afin de suivre les paramètres hématologiques et biochimiques avant et après infection.

Raffinement :

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

Les manipulations des animaux seront réalisées exclusivement par du personnel formé et compétent.

Réduction :

Pour ce projet, il est prévu d'utiliser au total jusqu'à 30 macaques cynomolgus (mâles et femelles) par an, soit un total de 150 animaux sur 5 ans. Ce nombre total pourrait être réduit, car la procédure 1 dont le but est de mettre au point le modèle d'infection par le VRS ne sera réitérée que dans le cas où la souche virale est différente. Concernant l'évaluation de candidats vaccins dans ce modèle d'infection (procédure 2), le nombre d'animaux utilisés sera dépendant du nombre de formulations vaccinales (jusqu'à 20 animaux maximum avec jusqu'à 5 groupes de 4 animaux). Ce nombre a été réduit au minimum pour obtenir des résultats interprétables et transposables à l'Homme. Les animaux utilisés proviendront d'un élevage agréé et l'ensemble du projet sera mené en accord avec la réglementation européenne et nationale.

7885 L'objectif de ce projet est de produire un médicament à usage humain à partir de sérum de lapins.

Ce médicament qui est l'un des médicaments majeurs actuellement prescrits dans la prévention et le traitement du rejet de greffes d'organes chez l'Homme est utilisé dans plus de 60 pays dans lesquels il fait l'objet d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM).

Pour la fabrication de ce médicament qui est composé d'anticorps polyclonaux, actuellement, la technique consiste à immuniser des animaux avec l'antigène pour qu'ils produisent les anticorps d'intérêt. Il n'existe pas de méthode alternative. Notre projet fait appel au lapin qui répond très bien aux immunisations, et permet d'obtenir un sérum de grande qualité.

Cette production de sérum à visée thérapeutique devrait nous amener à utiliser 60 000 lapins sur les 5 années à venir. Il s'agit d'une estimation du nombre nécessaire et minimum d'animaux qui seraient utilisés pour répondre à la demande des organismes de soins médicaux. En revanche, si la demande est inférieure, un nombre moins important de lapins sera utilisé.

Depuis l'obtention des premières AMM il y a 30 ans, les méthodes de production ont été constamment améliorées pour d'une part intégrer toutes les réglementations et bonnes pratiques applicables (hébergement, formation du personnel, prise en compte de la souffrance animale, bien-être des animaux) et d'autre part limiter le nombre d'animaux utilisés grâce à l'amélioration des rendements de purification du sérum. Les lapins sont hébergés en groupes sociaux sauf lorsqu'ils sont incompatibles. Les immunisations et les prélèvements sont réalisés par du personnel expérimenté. Les injections et

prélèvements sont peu invasifs. Durant leur séjour dans le centre de production, on fournit aux lapins des moyens de grignoter, se cacher, et des plateformes permettant aux lapins de se percher sont en cours d'installation, pour répondre à leur besoins comportementaux élémentaires.

7886 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initiée de nombreux programme de recherche, auparavant orientée vers l'augmentation des performances et de l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins.) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols.) ou attentes sociétales (bien être animale, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation.). Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateurs à un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des moutons castrés. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser. De par son caractère générique, les résultats qu'il permet d'obtenir sont le plus souvent extrapolables aux autres catégories de ruminants (bovins, caprins, brebis et agneaux). Pour certaines études, en particulier pour la compréhension des mécanismes de digestion et de mesure de la cinétique de dégradation des aliments, le recours à des animaux porteurs de canules est indispensable. Le projet dure 5 ans et les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année d'un groupe de 75 ovins mâles castrés dont près d'un tiers porteur de canules. Ceci implique de renouveler un tiers de cet effectif chaque année ce qui représente un effectif total sur 5 ans de 175 animaux.

La règle des 3R a été prise en compte durant toute la durée d'élaboration du projet et de cette demande, premièrement il n'est pas possible de remplacer l'animal dans cette étude car il existe une méthode alternative mais qui nécessite un nombre limité d'animaux (3) de type *in vitro*, mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation. Cependant, elles sont mises en œuvre dès que possible et servent à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés et la sévérité des procédures appliquées, l'approche en carré latin est aussi largement utilisée pour réduire le nombre d'animaux utilisé. Troisièmement, tout est mis en œuvre pour raffiner les procédures expérimentales, les conditions d'hébergement et l'utilisation des animaux en utilisant par exemple en limitant la durée d'hébergement en stalles de digestibilité, en ayant des temps de repos suffisant entre procédure pour les animaux. De plus les animaux seront suivis quotidiennement pour s'assurer de la bonne santé des animaux.

7887 Le cancer est à l'heure actuelle un enjeu de santé publique mondiale. Malgré des efforts considérables pour lutter contre cette maladie et trouver des traitements efficaces, cette pathologie reste l'une des principales causes de décès chez l'homme derrière les maladies cardiovasculaires dans le monde et en France.

Cette maladie complexe peut prendre des formes extrêmement variées en fonction des organes et des tissus affectés. Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales ayant acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme. Celles-ci prolifèrent indéfiniment soit en formant une tumeur maligne et/ou des métastases dans un organe, on parle de tumeurs solides, soit en circulant dans le sang ou la lymphe sans constituer de masse, on parle de tumeurs liquides tel que les cancers hématologiques (lymphome hodgkinien ou non hodgkinien, leucémie lymphoblastique ou myeloblastique...). Il est donc primordial de développer de nouvelles thérapies innovantes ciblant ces cellules cancéreuses et ces métastases tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Les phases d'étude et de développement de ces nouveaux composés sont validées dans un premier temps par des tests *in-vitro* sur des cellules en culture, mimant artificiellement la pathologie de l'homme. Grâce à ces tests *in-vitro*, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées. Toutefois, le recours à l'animal reste incontournable par sa complexité physiologique. Il permet de démontrer l'activité et l'efficacité anti-tumorale de ces composés. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse. Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris : en oncologie, l'utilisation de la souris est

largement décrite dans les publications en recherche préclinique et ces modèles sont davantage déployés chez la souris que chez le rat.

Pour pouvoir effectuer ces évaluations *in-vivo*, il est indispensable d'utiliser des modèles tumoraux, maîtrisés et bien caractérisés, en créant des modèles très proches de la pathologie de l'homme. Parmi ces modèles, il en existe deux types : ceux dits « orthotopiques », c'est-à-dire des greffes de cellules implantées directement sur leur lieu d'origine (ex : injection de cellules tumorales hématologiques directement dans le sang) et ceux dits « ectopiques », c'est-à-dire des greffes de cellules implantées en dehors de leur lieu d'origine (ex : injection de cellules de mélanome directement dans le sang) pour mimer des métastases expérimentales en court-circuitant les premières étapes du phénomène métastatique.

Dans ce projet, nous avons ainsi pour objectif de mettre en place un modèle tumoral par injection de cellules en intraveineuse (IV) dans le but de mimer soit des cancers hématologiques soit des métastases expérimentales.

Pour ce faire, nous devons déterminer les conditions optimales de greffe (nombre de cellules à injecter, taux de prise, jour d'apparition des métastases, souche de souris, etc...) de manière à disposer d'un modèle fiable et robuste, utilisable pour la sélection de candidats médicaments et ce, pour chaque type de tumeurs étudiées. Cette étape est primordiale puisqu'elle va permettre d'adapter le nombre de souris à greffer dans les études pharmacologiques et d'évaluer l'efficacité des produits dans les meilleures conditions expérimentales.

Les souris utilisées seront soit immunodéprimées (c'est-à-dire avec un système immunitaire déficient voir absent) pour permettre la greffe de tumeurs humaines, soit immunocompétentes (c'est-à-dire avec un système immunitaire parfaitement fonctionnel) pour permettre la greffe de tumeurs murines nécessaire à l'évaluation de produits anti-cancéreux ayant recours au système immunitaire pour être actif et efficace (exemple de l'immunothérapie et des thérapies ciblées).

Une pré-sélection des conditions expérimentales sera réalisée avant le démarrage des études grâce à une recherche bibliographique en amont pour chacune des lignées tumorales à étudier.

Sur la base de ces informations, différentes concentrations de cellules tumorales seront injectées par voie intraveineuse à des souris. La croissance tumorale et la cinétique d'apparition des métastases seront suivies au cours du temps par un système d'imagerie optique (bioluminescent ou fluorescent) et nécessiteront de ce fait, l'emploi de cellules modifiées spécifiquement pour émettre fluorescence ou bioluminescence. L'imagerie optique est une technique non invasive qui permet de détecter des tumeurs non visibles à l'œil nu et de suivre le développement métastatique au cours du temps sur un même animal (ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux inclus/étude).

Si certaines de ces cellules modifiées n'existent pas sur le marché ou ne sont pas modifiables par nos soins, un suivi en cinétique sera alors envisagé grâce à des prélèvements d'organes et de sang qui seront analysés, *ex-vivo*, par des techniques histologiques, biochimiques, immunophénotypiques et/ou moléculaires.

La dissémination tumorale sera mesurée 2 à 3 fois/semaine. Les souris feront l'objet d'une surveillance spécifique et accrue à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour identifier les éventuels signes de souffrance, notamment dans les phases critiques de l'établissement du modèle. Les points limites prédéfinis pour l'établissement seront appliqués si besoin et une grille d'observation spécifique et adaptée au modèle sera établie sur la base des données recueillies dans ce projet pour les futures études pharmacologiques.

Dans un souci de bien-être animal, les souris seront stabulées en groupe sociaux pendant toute la durée de l'expérimentation et bénéficieront d'un enrichissement du milieu sous forme de tubes de coton de manière à favoriser leur instinct de nidification.

Au cours de ce projet qui s'échelonnnera sur 5 ans, et compte-tenu du nombre de lignées tumorales pouvant être étudiées, nous estimons utiliser 810 souris. Ce nombre permettra de mettre au point 2 modèles par an, en moyenne.

7888 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, l'innocuité et la tolérance locale des candidats médicaments doivent être évaluées pour déterminer la sécurité

d'utilisation du produit avant application chez l'espèce cible. Le lapin est une espèce très sensible utilisée pour ces évaluations.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de tolérance chez le lapin dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs. Plusieurs études de tolérance pourront être requises pour établir le profil tolérance du produit.

Ces informations sont indispensables avant de passer dans l'espèce de destination du médicament.

L'espèce cible du présent projet est le lapin, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de tolérance, en administration unique ou répétée. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (exemple : tolérance locale), le nombre de voie d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires correspondants en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 500 lapins.

Le projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement. Il vise à caractériser les effets locaux de nouveaux produits chez le lapin, sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement, et d'indicateurs précoces, dans une expérimentation animale, de toute souffrance ; ces derniers sont définis selon une grille d'évaluation élaborée (et régulièrement revue) conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique et les expérimentateurs.

-les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,

-tous les traitements, prélèvements et euthanasies seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU,

-depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

-les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal.

-il pourra être nécessaire d'administrer un traitement concomitant pour évaluer l'effet recherché.

Ce projet couvre également

-le recueil de tissus ou de matrices dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bioanalyse

-l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, et/ou la génération de données historiques

7889 Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un

mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature. Les souris immunisées, seront des animaux génétiquement modifiés pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique).

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse *in vivo* de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire.

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'AcM 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 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x10).

Le temps minimum d'immunisation est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Après anesthésie, une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le 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 socialisation.

7890 L'Anguille européenne est un poisson migrateur amphihalien dont les stocks sont en constante diminution depuis les années 80. Un plan de conservation a été mis en place en 2007 au niveau européen et transcrit au niveau national dans le Plan National de Gestion de l'Anguille. Ce plan prévoit notamment des opérations de repeuplements, visant à contribuer à restaurer les stocks. Après les déversements des civelles, des prélèvements réguliers sont réalisés dans le milieu naturel pour évaluer la contribution de l'alevinage. Le succès de ces opérations de repeuplement ne peut être évalué que par le biais de marquages des anguilles introduites. Les marqueurs externes ont généralement des rétentions très courtes, ce qui limite leur utilisation. Les marqueurs fluorescents permettent de marquer rapidement et par balnéation de quelques heures de grandes quantités de poissons. Ces molécules se combinent au calcium et se fixent durablement dans les structures osseuses. Le sacrifice des poissons est généralement obligatoire pour rechercher la présence de la marque, ce qui reste contestable pour une espèce en danger critique d'extinction. En outre, le temps de préparation et d'analyse des pièces calcifiées rend ces suivis coûteux. Toutefois, l'un des marqueurs fluorescents, la calcéine, présente la particularité d'être également détectable sur des poissons vivants, au niveau des nageoires et de la tête, à l'aide d'un détecteur spécifique.

La présente étude est une étude de faisabilité. Elle doit permettre de comparer l'efficacité de deux protocoles de marquage à la calcéine. La méthode du choc osmotique consiste à placer les individus dans une solution légèrement salée qui favorise la sortie d'eau des cellules, ce qui, lors du bain qui suit, doit permettre une nouvelle entrée d'eau chargée en calceïne dans les cellules. Le proto 1 consistera en un choc osmotique puis exposition courte (7 min) dans une solution de calceïne à forte concentration ; le proto 2 consistera en une balnéation longue (3h) dans une solution de calcéine peu concentrée. De plus, la lumière a un effet à la fois sur la tenue de la calcéine et sur la vitesse de pigmentation chez la civelle. Ainsi le facteur lumière peut beaucoup influencer sur la visibilité de la marque. Afin de prendre en compte ce facteur, 3 lots de civelles issus du proto 1 et 3 lots de civelles issus du proto 2 seront soumis à 3 conditions de lumière : faible luminosité (L-), forte luminosité (L+), et forte luminosité avec abri (A). De plus, l'anguille présentant une légère fluorescence naturelle, 2 lots serviront de contrôle et seront soumis respectivement à des conditions de forte et de faible luminosité. Ils serviront à évaluer la mortalité sans opération de balnéation et à quantifier l'intensité de la fluorescence naturelle pour des individus soumis à forte ou à faible luminosité. La présence d'une marque fluorescente sera recherchée sur poisson anesthésié, 24 après marquage (J+1 : 5 civelles par lot) puis 15 jours après marquage (J+15, environ 32 civelles par lot). Afin d'obtenir des niveaux de fluorescence précis et indépendants de l'effet "observateur", 110 individus (dont 40 à J+1, et 70 à J+15) seront ensuite euthanasiés. Sur ces poissons chaque point de fixation de la calcéine sera examiné et précisément quantifié sous microscope à fluorescence.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé pour répondre à la question posée, car l'étude vise à terme à rechercher la marque sur des anguilles issues du repeuplement (règle des 3 R : Remplacement). Nous avons en tout 8 lots dont 2 contrôles non marqués (L+ et L-), 3 lots marqués selon le proto 1 + 3 lots marqués selon le proto 2. Un effectif de 296 civelles est nécessaire de manière à comparer les différents traitements. Nous partons sur 37 individus par lot. 5 civelles par lot seront utilisées à J+1, pour le point zéro, restera 32 civelles. Compte tenu des risques faibles de mortalité, nous devrions terminer l'expérience avec environ 30 individus, ce qui permettra de caractériser chaque lot par sa moyenne et sa variance. La quantification sur animal mort se fera sur un sous-échantillon réduit au maximum : 5 individus par lot à variabilité attendue faible (soit à J+1 pour tous les lots, et à J+15 pour les lots non marqués) ; 10 individus par lot à variabilité attendue plus importante (soit à J+15 pour les lots marqués). Soit 110 individus euthanasiés en tout, les autres

seront relâchés en milieu naturel (règle des 3 R : Réduction). Les civelles seront acclimatées à la pisciculture avant le début d'expérience, la température sera contrôlée, et le comportement des civelles sera observé lors des différentes étapes du marquage de manière à éviter toute mortalité. La stabulation sera réalisée en circuit ouvert sur eau de rivière décantée. Les interventions humaines consisteront en un passage quotidien pour vérification des paramètres physico-chimiques et vérification visuelle de la survie. L'intervention dans les bassins ne sera réalisée que si nécessaire afin de réduire tout stress (règle des 3 R : Raffinement).

7891 L'ostéomyélite est une infection bactérienne de l'os et du tissu osseux caractérisé par une réponse inflammatoire aigue ou chronique menant à une perte osseuse. La bactérie responsable isolée en culture est dans 60% des cas un staphylocoque doré avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés. Les options pour le traitement de ces infections sont limitées par des facteurs pharmacocinétiques (comme la pénétration des antibiotiques dans les tissus osseux) et la sensibilité de la bactérie en cause au traitement. Il apparaît également illusoire de penser qu'un antibiotique utilisé par voie générale ne pénètre que la zone tissulaire infectée. Le microbiote subit alors une pression de sélection pouvant permettre, à distance du site, l'émergence de mutants résistants.

Parmi les antibiotiques les plus utilisés, la vancomycine et le linézolide sont les plus prescrits en cas d'infection à *Staphylococcus aureus*. Ces molécules induisent des effets secondaires ou indésirables allant de légers (nausées, vomissements...) à graves (réactions anaphylactoïdes, ototoxicité, néphrotoxicité, neutropénie...).

Il apparaît donc nécessaire de trouver de nouvelles alternatives permettant de traiter localement l'infection pour faire face à l'augmentation de la résistance des souches de *Staphylococcus aureus* et ainsi d'améliorer la prise en charge des infections ostéo-articulaires.

Le but de notre étude sera d'évaluer l'efficacité d'un nouveau système de délivrance de daptomycine dans un modèle expérimental d'ostéomyélite à *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM) chez le lapin et de comparer cette efficacité avec celle de la daptomycine et de la vancomycine administrée par voie intraveineuse (IV).

Pour cela, 108 lapins femelles néo-zélandais seront utilisés.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R (Remplacer, Réduire, Raffiner). L'évaluation et la comparaison de l'activité d'un antibiotique sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

- Réduction.

Le nombre de lapin a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Une analyse de variance (ANOVA) sera utilisée pour comparer les effets entre les différents groupes. En cas de résultats significatifs, le test de Student-Newman-Keuls sera réalisé pour la comparaison des groupes deux à deux.

- Raffinement.

-Avant l'expérimentation :

Choix de la souche et modèle : La souche choisie correspond à celle retrouvée lors des infections osseuses chez l'homme.

Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, dont l'alèse est changée tous les 2 jours, avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique).

Détermination des points limites : figure 3, annexe 1.

- Pendant l'expérimentation :

Soins pré et postopératoires : Utilisation d'un anesthésiant locale sur l'oreille afin d'éviter toute douleur et tout stress au moment de l'insertion de cathéter veineux et sur la peau des lapins 3 minutes avant l'incision. Traitement antalgique : pose de patch morphinique à l'intérieur de l'oreille J-1 avant

infection, puis tous les 3 jours. Opérations réalisées sur tapis chauffant, contrôle de la température pendant opération (et pendant tout le protocole), réveil sous lampes chauffantes.

L'infection et le débridement sont réalisés sous anesthésie générale : injection intramusculaire (IM) d'une solution imalgène (35mg/kg) / xylazine (5mg/kg)

Application des points limites (cf raffinement avant expérimentation)

Le bien-être des animaux sera surveillé tout au long de l'étude.

7892 Le prurit est un signe clinique caractéristique d'allergie cutanée comme la dermatite atopique chez le chien. Le but de ce projet est de tester en conditions réelles l'effet antiprurigineux de différents traitements chez le chien. Aucune méthode alternative ne permet actuellement de reproduire la réponse d'un être vivant, il est indispensable de recourir à l'animal entier pour étudier l'efficacité du produit. Le prurit sera induit par une injection intraveineuse d'interleukine. Une première étape consistera à mettre en place ce modèle (choix de l'interleukine, dose) afin d'obtenir un prurit d'intensité moyenne et réversible (<24h) et à valider ce modèle en comparant les résultats obtenus avec ceux obtenus dans les publications. Dans un second temps différents médicaments candidats seront évalués par simple observation sur leur efficacité à diminuer ou à inhiber ce prurit induit. Un suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma), de biomarqueurs est également possible ainsi que des tests d'intradermoréactions.

Ce projet se déroulera selon plusieurs procédures expérimentales dont l'administration d'interleukine, l'administration du produit à tester et des prélèvements sanguins répétés afin de suivre la pharmacodynamie et pharmacocinétique des produits administrés, et mise en place des tests d'intradermoréactions. Seuls des chiens seront utilisés. Le nombre de prélèvements sanguins sera toujours réduit au minimum.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés en groupe sauf 48h avant l'induction du modèle et 24 h après afin de pouvoir observer les animaux. L'hébergement des animaux est conforme au programme d'enrichissement (présence de jouets dans les boxes.).

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, présence de plaies, consommation alimentaire et hydrique.).

Le nombre d'animaux par étude sera réduit au minimum tout en évitant de compromettre les résultats du projet lié à la variabilité interindividuelle. Au total, 250 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

7893 Dans le cadre de la lutte anti-dopage, l'Agence Mondiale Anti-dopage (AMA) a interdit l'utilisation d'IGF-I et de ses analogues par les sportifs, ces composés pouvant être utilisés pour leur action de facteur de croissance et de régulateur glycémique lors de la prise de masse musculaire.

Trois analogues principaux d'IGF-I existent, développés pour avoir une durée d'action plus prolongée dans le temps. Cependant à l'heure actuelle, aucun de ces analogues n'est autorisé pour usage thérapeutique chez l'homme et les études scientifiques se sont limitées aux effets chez l'animal. Toutefois des sites internet de vente de produits pour la musculation, qui sont en pleine expansion, proposent déjà ces composés et des blogs sur internet témoignent de l'usage non contrôlé de ces composés chez l'homme.

Pour limiter cet usage, il est nécessaire de pouvoir identifier ces composés dans le cadre de contrôles anti-dopage. Une méthode de détection a été mise au point *in vitro* mais il est nécessaire de vérifier la capacité à identifier les analogues d'IGF-I après une administration chez l'animal, afin de mieux cerner la fenêtre de détection de ces 3 composés. La présente étude consistera donc à administrer en intramusculaire un placebo ou un analogue d'IGF-I sous anesthésie à 24 rats (4 groupes, correspondants à 3 analogues et un placebo administrés, de 6 rats Wistar mâles d'environ 8 semaines :) et à prélever des échantillons sanguins entre 4h et 48h après. Cette étude nécessite l'utilisation de rats, la dégradation et l'élimination des produits injectés ne peut se modéliser *in vitro* et nécessite des organismes dans leur intégralité. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie. Les rats seront surveillés quotidiennement. Ces échantillons seront analysés pour tester

la sensibilité de la méthode de détection *in vivo* et valider son utilisation pour des contrôles anti-dopage chez l'homme.

7894 Les myopathies mitochondriales (MM) représentent un groupe de maladies génétiques rares. La caractéristique principale de cette famille de pathologie est un défaut du métabolisme. Les manifestations cliniques sont, entre autres, une faiblesse musculaire, une hypotonie et une intolérance à l'exercice. Bien que plusieurs pistes thérapeutiques soient explorées, il n'existe à ce jour aucun traitement curatif.

De manière intéressante, des effets bénéfiques sur la durée de vie et la production de force *in vitro* ont été récemment rapportées suite à l'administration d'un agent pharmacologique (Ciclosporine A, CsA) chez un modèle murin reproduisant une forme sévère de la pathologie. L'efficacité d'une telle approche thérapeutique doit à présent être évaluée *in vivo* au niveau préclinique (Remplacement).

Le but de ce projet est de caractériser la fonction musculaire squelettique ainsi que les effets sur la fonction musculaire d'agents pharmacologiques, plus ou moins sélectifs, chez des modèles de souris reproduisant une forme sévère et une forme légère de la maladie.

Les limites liées à l'analyse des biopsies musculaires impliquent l'utilisation d'un modèle vivant.

Les expérimentations seront réalisées à l'aide d'un dispositif expérimental permettant une exploration totalement non-invasive de la fonction musculaire (i.e. force, métabolisme, anatomie) chez les souris contrôles et transgéniques dans des conditions physiologiques *in vivo* (Raffinement). Ces expérimentations seront répétées sur les mêmes animaux permettant ainsi un suivi longitudinal *in vivo*. Ce dispositif permet ainsi de réduire de manière drastique le nombre d'animaux utilisés (Réduction). Des souris contrôles et transgéniques seront testées avant puis 4 semaines après l'administration d'agents pharmacologiques ou d'un placebo.

Pour les modèles reproduisant les formes sévère et légère, la taille de l'échantillon (i.e. respectivement 12 et 16 souris maximum) a été déterminée à l'aide d'une analyse statistique prévoyant une diminution de 15% de la force moyenne au cours de l'exercice chez les souris transgéniques. Pour chaque agent, la taille de l'échantillon (i.e. 17 souris maximum pour le modèle de forme sévère et 10 souris pour le modèle de forme légère) a été déterminée à l'aide d'une analyse statistique prévoyant une augmentation de 20% de la force moyenne au cours de l'exercice chez les souris transgéniques traitées. Des points limites seront mis en place afin de limiter au maximum la douleur éventuelle. Au total, dans cette étude 162 souris seront testées.

7895 Le but de ce projet est de tester chez la souris une nouvelle molécule à visée thérapeutique dans le cadre d'une maladie rare, la glycogénose de type 1a. Le maintien de la glycémie autour de 100 mg/dl est crucial et nécessite la production de sucre par l'organisme dès la fin de la digestion d'un repas. La glycogénose de type 1a se caractérise par des hypoglycémies sévères lors de jeûnes courts entrainées par l'incapacité de l'organisme de produire du glucose (sucre) en dehors des repas. De plus, ces patients développent des pathologies associées à l'accumulation de glycogène (stock de sucre) et de graisses dans le foie et les reins.

La preuve d'efficacité de cette molécule a été démontrée dans un modèle de souris transgéniques qui développent la pathologie uniquement dans le foie. Ces souris sont un modèle unique pour cette étude puisqu'elles ne peuvent pas utiliser leur stock de glycogène et se caractérisent par un gros foie et une hypoglycémie légère au court d'une période de jeûne court. Cependant, elles sont capables de réguler leur glycémie au cours d'un jeûne plus long grâce à une induction de la production de glucose par les reins et l'intestin, organes non touchés par la maladie. L'accumulation de glycogène dans le foie n'entraîne pas de souffrance ou mal-être chez les animaux jeunes qui seront étudiés (âgés de moins de 6 mois).

Lors d'une étude précédente, l'injection unique de la molécule étudiée dans ce projet a permis aux souris atteintes de glycogénose de type 1a de diminuer significativement les stocks de glycogène après un jeûne prolongé de 24h et de réguler leur glycémie de façon similaire à des souris non malades. Ces premiers résultats, obtenus 4 jours après le traitement, sont très encourageants et ont permis de valider cette approche. Nous proposons d'étudier l'effet de plusieurs injections et plusieurs doses de cette molécule, administrées par voie intraveineuse, sur la régulation de la glycémie et

l'utilisation des stocks de glycogène au cours d'une période de jeûne. Les souris traitées devraient être capables de produire du glucose grâce à la dégradation des stocks de glycogène du foie, et ainsi réguler leur glycémie. Pour analyser leur effet thérapeutique, ces molécules doivent être injectées chez l'animal avant de proposer de nouvelles perspectives de traitement aux patients.

Ce projet sera réalisé en respectant la règle des 3R.

Remplacement :

L'efficacité des molécules à tester a été validée *in vitro* en cellules mais seul le traitement des animaux atteints de GSD1 permettra de valider leur efficacité sur le tissu ciblé, c'est à dire le foie, après leur injection dans la circulation sanguine.

Réduction :

Le nombre de souris a été calculé au plus juste à partir des connaissances de la pathologie dans ce modèle animal et du métabolisme glucidique (utilisation des stocks de glycogène du foie, régulation de la glycémie au cours du jeûne) et des résultats d'études précédentes ayant permis de valider la preuve de concept. Afin de pouvoir faire une analyse statistique, des groupes de 6 souris seront analysés. Au total, ce projet nécessitera l'obtention de 156 souris mâles transgéniques. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Un groupe de 18 souris non transgéniques sera utilisé comme contrôles.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les souris seront hébergées par groupe, dans un milieu enrichi pour favoriser la nidation. Le nombre d'injections de tamoxifène pour induire la pathologie a été réduit à 3 injections au lieu de 5 injections intra péritonéales à l'âge adulte. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement pour suivre leur prise de poids. Un anesthésique local sera appliqué avant l'injection dans la veine de la queue ou prise de sang. La connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites, en contrôlant les périodes de risque d'hypoglycémie. L'atteinte des points limites lors d'une mise à jeun entraîne l'injection de glucose et la renutrition de la souris. Pour limiter les hypothermies liées au développement des hypoglycémies, les animaux auront la possibilité de se réchauffer en disposant une partie de la cage sur une plaque chauffante. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou lors de l'atteinte d'un point limite défini dans le projet selon les méthodes autorisées par la législation.

En conclusion, ces études réalisées chez la souris pourraient permettre de proposer une nouvelle approche thérapeutique dans le cadre de la glycogénose de type 1a. Au total, cette étude nécessitera 174 souris sur une durée de 2 ans.

7896 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires destinés à être administrés au chien, des études de tolérance et/ou d'efficacité sont requises pour justifier de la sécurité et de l'efficacité du candidat-médicament.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de tolérance locale chez le chien, et/ou de l'efficacité du produit en développement dans des modèles induits d'otite et de prurit (signe clinique caractéristique d'allergie cutanée). Plusieurs études pourront être requises pour répondre à l'ensemble de ces questions selon l'état d'avancement du développement du produit.

Ces informations sont exigées par les autorités pour la constitution du dossier de demande d'autorisation de mise sur le marché du produit final. Ces études doivent être conduites dans l'espèce cible dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs (remplacement, réduction et raffinement).

L'espèce cible est le chien, jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études. Le nombre d'animaux inclut dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (évaluation de la tolérance, preuve de concept d'efficacité, validation de l'effet pharmacologique) et dans le respect des textes réglementaires, lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 300 animaux.

Le projet (dénommé par la suite protocole cadre) vise à définir les conditions de réalisation des études de tolérance et/ou d'évaluation de l'effet pharmacologique chez le chien sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal

-tous les traitements et prélèvements seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

-depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

-pour une meilleure surveillance et une prise en charge rapide des animaux en cas d'anomalie, ces derniers pourront éventuellement être suivis par vidéo surveillance,

-les points limites sont, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, perte d'appétit dans les jours suivant les traitements, perte de poids ; toute observation laissant présager un début de mal-être est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal

-les animaux sont hébergés à demeure pendant 4 à 5 ans et pourront participer plusieurs fois aux procédures décrites dans le présent projet. La décision de réutiliser un animal dans une procédure expérimentale sera prise par le vétérinaire si les conditions de l'article R2014-1 13 du Code rural et de la pêche maritime sont remplies.

Ce projet couvre également le recueil de sang dans le but de préparer des matrices témoins requises pour la validation des méthodes de dosage des échantillons générés dans ce projet.

7897 La migraine est une pathologie qui a un fort impact sur la santé publique (12-15% de la population touchée). Les traitements pharmacologiques actuels montrent une efficacité limitée, tout particulièrement au stade chronique de la maladie (plus de 15 jours de migraine par mois).

Le développement et l'évaluation des effets antalgiques de nouvelles molécules est donc indispensable pour l'amélioration des thérapeutiques. Nous proposons pour ce projet d'évaluer les effets d'une nouvelle molécule de synthèse (appelée ici DX pour des impératifs de confidentialité) dans un modèle de migraine par donneur de monoxyde d'azote (NO) chez le rat. L'étude et l'analyse de la douleur ne permet pas l'utilisation de méthodes alternatives à celle d'animaux vivants. En effet, la douleur est le résultat de mécanismes complexes intégrés au sein d'un système nerveux central.

Chez le rat male, nous testerons l'hypersensibilité cutanée faciale développée à la suite d'injections intrapéritonéales (i.p) d'isosorbide dinitrate (ISDN, 10mg/kg), connu comme un donneur de monoxyde d'azote vasodilatateur et qui déclenche aussi chez l'homme des crises de migraines. Une des signatures comportementales du passage au stade chronique de la migraine est l'hypersensibilité à la douleur mécanique cutanée appelée allodynie qui représente en plus de la douleur spontanée un symptôme très handicapant pour les malades. Nous proposons donc de tester les effets de la nouvelle molécule sur la réponse motrice nociceptive à la stimulation mécanique (retrait de la face) de rats soumis à 1 (stade aigu) ou 5 injections répétées (stade persistant) d'ISDN. Pour ce projet et afin de respecter la règle des 3R nous utiliserons un nombre limité de rats et de groupes tout en gardant la significativité des résultats via une analyse statistique adaptée (analyse de variance suivi d'un test post-hoc paramétrique si distribution normale ou test non paramétrique dans le cas contraire). Le nombre de rats par groupe a été fixé à 10 en tenant compte du fait, qu'en moyenne et d'après les études précédentes, 20 % des rats ne sont pas répondeurs à l'ISDN. L'effet de la substance sera testé à la suite d'une injection sous cutanée (sc) de 2 doses de DX et comparé à un groupe témoin (sérum physiologique NaCl 0.9%) correspondant et à un contrôle positif correspondant à l'injection d'un antimigraineux de référence, le sumatriptan. Quatre groupes de rats seront utilisés dans la condition stade aigu (1 groupe témoin, 2 groupe test DX 5 mg/kg et 10 mg/kg, 1 groupe sumatriptan 300µg/kg s). Quatre groupes de rats seront utilisés dans la condition stade persistant (idem à preced). Dans la première condition, les animaux seront testés à la suite d'une seule injection d'ISDN et dans la 2ème suite à 5 injections d'ISDN répétées (1/jour). Au total 80 animaux seront utilisés dans ce

projet. Le nombre d'animaux par groupes et du nombre de groupes est réduit au maximum tout en permettant une discrimination des effets antalgiques potentiels.

Sachant que cette étude, du fait même de sa nature, ne permet pas d'administrer d'autres antalgiques, les conditions d'hébergement sont optimisées (enrichissement social et environnement), le test de sensibilité mécanique respecte les règles éthiques édictées par l'international association « for the study of pain » puisqu'il permet l'échappement de l'animal vis à vis du stimulus qui présente d'autre part une durée très courte (douleur évoquée de faible intensité à modérée) : 3 sec par stimulation mécanique. Cependant, lors des sessions injections répétées (5 jours), toute observation (visite au moins 2 fois par jour) de signes (points limites) tels que la prostration, paralysie, convulsions, perte de poids >15%, apathie mettraient fin à l'expérimentation pour ces animaux par une mise à mort par injection létale d'anesthésique. Tous les animaux (2 conditions) seront mis à mort à la fin de la procédure par injection létale d'anesthésique. Par ce projet, nous entendons montrer et caractériser chez le rat le pouvoir antalgique (supérieur au traitement de référence) de cette nouvelle molécule dans le cas de la douleur (allodynie) migraineuse aussi bien au stade aigu que chronique.

7898 L'ostéomyélite est une infection osseuse d'origine bactérienne caractérisée par une réponse inflammatoire aiguë ou chronique menant à une perte osseuse. *Staphylococcus aureus* est, dans 60% des cas, la bactérie responsable avec un taux de résistance à la méticilline en constante augmentation. Ces infections nécessitent des traitements longs et des actes chirurgicaux afin de retirer les tissus nécrosés.

Le problème est d'autant plus compliqué lorsque l'infection est due à des bactéries persistantes. Ce phénomène, différent de la résistance bactérienne due à des mutations génétiques, montre que sur une même population bactérienne, une partie sera détruite par l'agent anti-infectieux tandis que l'autre partie des bactéries va cesser de se multiplier, restant simplement à l'intérieur de la cellule. Ces bactéries persistantes peuvent toutefois se retransformer en agent infectieux à croissance rapide, provoquant une rechute dès l'arrêt de l'antibiotique.

Les options pour le traitement de ces infections sont limitées par des facteurs pharmacocinétiques (comme la pénétration des antibiotiques dans les tissus osseux) et la sensibilité au traitement de la bactérie en cause. Il apparaît également illusoire de penser qu'un antibiotique utilisé par voie générale ne pénètre que la zone tissulaire infectée. Le microbiote subit alors une pression de sélection pouvant permettre, à distance du site, l'émergence de mutants résistants.

Parmi les antibiotiques les plus utilisés, la vancomycine, le linézolide et la daptomycine sont les plus prescrits en cas d'infection à *Staphylococcus aureus*. Ces molécules induisent des effets secondaires ou indésirables allant de légers (nausées, vomissements) à graves (réactions anaphylactoïdes, ototoxicité, néphrotoxicité, neutropénie).

Il apparaît donc nécessaire de trouver de nouvelles alternatives permettant de traiter localement l'infection, tels que les vecteurs d'antibiotique qui permettent de transporter les antibiotiques directement sur le site infecté.

Le but de cette étude sera donc d'évaluer l'efficacité de plusieurs associations vecteur/antibiotique dans un modèle d'ostéomyélite à *S. aureus* et de la comparer à celle de l'antibiotique seul.

Afin de mener à bien ce projet, un nombre de 980 souris (au maximum) sera nécessaire.

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacer : l'évaluation et la comparaison de l'activité d'un anticorps sur une souche ne peuvent pas être simplement réalisées de façon *in vitro* (faible corrélation *in vitro-in vivo*).

-Réduire : le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable. Une analyse de variance (ANOVA) sera utilisée pour comparer les effets entre les différents groupes. En cas de résultats significatifs, le test de Bonferroni sera réalisé pour la comparaison intergroupe.

-Raffiner :

-Avant l'expérimentation :

Choix des souches : Chez l'homme, *Staphylococcus aureus* est responsable dans 60% des cas de l'ostéomyélite. C'est pourquoi, nous avons décidé d'étudier des souches de *Staphylococcus aureus*.

Conditions d'hébergement : Acclimatation des animaux durant une semaine avant l'expérimentation. Assurance d'une non surpopulation dans la salle d'hébergement. Les animaux sont conservés dans des cages répondant aux dernières normes, enrichies avec des frisottis. La litière est changée une fois par semaine avec accès libre à l'eau et à la nourriture (alimentation spécifique pour rongeur).

Détermination des points limites : figure 5, annexe 1.

-Pendant l'expérimentation :

Soins pré et postopératoire : Les souris recevront une injection sous cutanée de 30µL de buprénorphine (0,1mg/kg) 30minutes avant l'infection puis 8h après. Cette injection sera renouvelée 2 fois par jour pendant 72h (période de sévérité du protocole).

Evaluation des signes généraux : Application des points limites (cf. raffinement avant expérimentation)

7899 La conception de nouveaux aliments ou ingrédients fonctionnels pour le contrôle de l'appétit et du poids corporel représente une stratégie prometteuse pour contribuer à la lutte contre l'épidémie d'obésité. L'oleoylethanolamide (OEA) est un dérivé du métabolisme des lipides, produit de manière endogène chez l'Homme, et qui montre de fortes propriétés anorexigènes (diminution de l'appétit) chez le rongeur lorsqu'il est utilisé comme un médicament. Cependant, son activité comme ingrédient alimentaire dans un aliment spécifiquement conçu à cette intention n'a jamais été testé et ses conséquences sur la régulation neurophysiologique de l'appétit ne sont pas connues. Ce projet de recherche, devant utiliser 32 mini porcs Yucatan au total, vise à tester l'hypothèse selon laquelle l'OEA peut moduler la voie endocannabinoïde au niveau de l'axe intestin-cerveau pour exercer un contrôle sur l'appétit et le poids corporel. Dans une première partie du projet, 16 miniporcs Yucatan (8 normopondéraux et 8 obèses) seront utilisés pour évaluer la biodisponibilité en OEA après ingestion d'aliments de matrices différentes (liquide vs. semi-solide, avec ou sans OEA) ainsi que la sécrétion d'hormones et neuropeptides, dans un paradigme en carré latin. Les mêmes animaux et le même paradigme seront utilisés pour évaluer l'effet de l'OEA et de la matrice alimentaire sur l'appétit et le comportement alimentaire, par le biais de repas tests suivant l'administration de l'aliment fonctionnel. Dans une seconde partie du projet, 16 mini porcs obèses (8 animaux supplémentés en OEA, 8 animaux contrôle) seront utilisés pour évaluer les effets d'une consommation quotidienne (durant 28 jours) d'OEA sur le poids corporel, les signaux de satiété, et les réponses cérébrales à des stimulations alimentaires. Tous les animaux subiront une chirurgie pour l'implantation d'un cathéter veineux permettant des prélèvements sanguins sériés. Pour l'imagerie cérébrale, les animaux seront placés sous anesthésie générale avec surveillance des constantes vitales. **REPLACEMENT** : l'objectif de cette étude étant de tester la biodisponibilité *in vivo* de l'OEA ainsi que ses effets sur l'appétit, le poids corporel et le fonctionnement cérébral, il est impératif de travailler sur animaux vivants. Il est à noter que cette étude a été précédée par une étude *in vitro* ayant permis la conception des deux aliments fonctionnels utilisés *in vivo*. **REDUCTION** : un effectif de 8 animaux par groupe représente un minimum absolu pour les études de comportement et d'imagerie cérébrale. Pour les mesures étudiées, cet effectif permet une puissance statistique suffisante pour observer des effets significatifs, le cas échéant. La méthode du carré latin dans la première partie du projet permet de réduire le nombre d'animaux, ceux-ci étant leurs propres contrôles. **RAFFINEMENT** : Les approches méthodologiques employées correspondent aux standards reconnus, comme l'analyse par chromatographie liquide et spectrographie de masse tandem (LC/MS/MS) pour l'analyse de la biodisponibilité de l'OEA, ou l'utilisation de l'imagerie par résonance magnétique fonctionnelle (IRMf) pour étudier les réponses cérébrales. La procédure d'anesthésie lors de l'imagerie cérébrale a été conçue et validée par un vétérinaire.

7900 La surdité est un handicap sensoriel fréquent, insuffisamment corrigé en France. Les surdités de perception, invalidantes socialement, sont réhabilitées par des aides auditives conventionnelles ou par la mise en place d'implants cochléaires. La cochlée, partie de l'oreille interne dévolue à l'audition, transforme les sons en signaux électriques qui sont transmis ensuite au cerveau. L'implant cochléaire stimule directement les neurones du nerf auditif, les cellules sensorielles étant détruites. L'administration locale de médicaments pourrait prévenir l'altération des structures neurosensorielles intra-cochléaires au cours de l'implantation cochléaire.

Malgré le caractère encore invasif de cette technique de réhabilitation, certains patients avec une audition persistante sur les fréquences graves peuvent bénéficier de l'implant cochléaire, avec des résultats satisfaisants qui encouragent à élargir encore les critères d'éligibilité actuels. Afin de préserver au mieux les structures neurosensorielles persistantes, des techniques chirurgicales mini-invasives sont développées et les porte-électrodes sont modifiés pour être le moins traumatisant possible. En effet, lors de l'insertion du porte-électrodes dans la cochlée, des traumatismes locaux sont générés et induisent une diminution des performances auditives. Parallèlement aux avancées technologiques de l'implantation cochléaire, le développement de traitements locaux est en plein essor, en alternative aux traitements par voie générale responsables d'effets secondaires du fait de la nécessité d'administrer de fortes doses de principe actif pour être efficace. Une administration locale consiste à déposer par injection le médicament dans l'oreille moyenne pour permettre sa diffusion dans l'oreille interne au travers de la membrane de la fenêtre ronde qui les sépare. A ce jour, peu de formes pharmaceutiques ont été développées spécifiquement pour cette voie d'administration.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'apport de médicaments administrés localement, pour prévenir les dommages engendrés par la chirurgie lors de l'insertion de l'implant cochléaire. La N-acétylcystéine et la dexaméthasone sont des substances actives prometteuses pour diminuer respectivement le stress oxydatif et la réaction inflammatoire engendrés par cette chirurgie.

Dans ce travail, nous testerons l'effet d'une formulation innovante constituée d'un gel d'acide hyaluronique contenant des vésicules lipidiques (liposomes) qui renferment le principe actif (la N-acétylcystéine). L'acide hyaluronique assure une rétention prolongée dans l'oreille moyenne grâce à son pouvoir adhésif ; les liposomes agissent comme un réservoir de principe actif pour une libération prolongée dans le temps, ce qui limite le nombre d'administrations.

L'innocuité du gel et la quantification des liposomes et de la dexaméthasone ont déjà été étudiées précédemment. Après avoir évalué l'innocuité de la N-acétylcystéine sur la fonction auditive du cobaye normo-entendant et son devenir *in vivo*, nous allons insérer des implants cochléaires chargés ou non en dexaméthasone. L'utilisation de principes actifs administrés localement, en traitement préventif, devrait permettre d'améliorer les performances auditives en diminuant les dommages causés sur les cellules neurosensorielles lors de l'insertion cochléaire. Deux méthodes seront testées pour apporter la substance active au moment de la chirurgie : le gel chargé en N-acétylcystéine et le porte-électrodes lui-même chargé en dexaméthasone. Nous recherchons un effet protecteur potentiellement additif de ces deux traitements locaux.

Ainsi, nous avons retenu le nombre de 68 cobayes normo-entendant pour garantir la validité statistique de l'étude. Un modèle animal est utilisé car une étude de l'audition est nécessaire pour tester ces deux approches thérapeutiques. A ce jour, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour l'étude de l'audition et la quantification de principes actifs dans les liquides de l'oreille interne. Les procédures expérimentales seront réalisées par un chirurgien ORL expérimenté et ont été conçues de sorte à supprimer toute souffrance des animaux.

7901 Suite à une infection sévère ou un traumatisme crânien, une baisse générale des défenses immunitaires a été décrite. Cette baisse de l'immunité peut entraîner à court terme de nouvelles infections graves et à moyen terme une baisse de l'immunité anti cancer.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) et *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) sont les deux bactéries fréquemment responsables d'infection grave. Au cours de l'infection bactérienne, la réponse immunitaire met en jeu plusieurs types de cellules immunitaires dont les cellules Natural Killer et les lymphocytes T régulateur dans le but de contrer cette infection. Lorsque l'infection est terminée, ces cellules changent de mode de fonctionnement et donnent lieu à une réponse anti-inflammatoire. Bien que nécessaire, cette réponse anti-inflammatoire affaiblit le système immunitaire et laisse la place à un état d'immunodépression. L'immunodépression favorise la dissémination de la maladie cancéreuse. Nous souhaitons étudier l'effet de l'infection pulmonaire à *P. aeruginosa* et *S. aureus* sur la diffusion métastatique du mélanome (cancer de la peau) dans un modèle murin.

Par ailleurs, dans une large cohorte de patients traumatisés crâniens, nous avons mis en évidence que la survenue de cancer dans les 5 ans suivant le traumatisme était plus fréquente que dans la population générale sans traumatisme. Au laboratoire, l'étude de modèle de traumatisme crânien

chez la souris nous a également permis de constater que les altérations de l'immunité après traumatisme étaient très proches de celle observée après une infection sévère.

Le but de notre étude est :

- 1- D'évaluer l'influence de l'infection à *P. aeruginosa* et *S. aureus* et du traumatisme sur la diffusion métastatique du mélanome dans un modèle murin
- 2- D'évaluer le rôle des cellules Natural Killer et des lymphocytes T régulateur dans ce processus
- 3- D'évaluer l'impact des traitements actuels (anti-PD1, anti-TNFR2) sur la fonction des cellules Natural Killer et des lymphocytes T régulateurs

Pour cela, 2460 souris mâles (fond génétique C57/B6) vont être utilisées (2100 C57/B6 et 360 C57/B6 foxp3GFP/DTR). Après avoir induit une pneumopathie ou un traumatisme crânien, nous injecterons des cellules de mélanome en intraveineux à la souris et évaluerons 14 jours plus tard sa diffusion métastatique. Nous prélèverons les poumons des souris.

L'utilisation d'animaux pour l'évaluation du rôle de l'infection sur la diffusion métastatique du mélanome et la compréhension des altérations immunologiques subies par les cellules Natural killer et les lymphocytes T régulateurs, nous permettra d'orienter la recherche et le développement dans le traitement et le contrôle du mélanome, et ne peut être aujourd'hui remplacé par des tests *in vitro*.

Le nombre de souris a été réduit au minimum afin de garder une analyse statistique fiable et le bien-être des animaux est surveillé tout au long de l'étude avec (i) évaluation quotidienne des signes généraux, (ii) mise en place d'un enrichissement continu des cages d'hébergement (frisotis), et (iii) mise en place d'un protocole d'analgésie selon les procédures expérimentales effectuées. Une grille d'appréciation a été mise en place avec un système de barème de point afin de minimiser au maximum l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse des souris et d'obtenir les informations pertinentes à moindre coût en termes de "bien-être" animal.

7902 La douleur aigue est nécessaire à la survie. Lorsqu'elle devient chronique ou persistante, à la suite d'une inflammation (douleur inflammatoire) ou d'une lésion nerveuse (douleur neuropathique), la douleur n'offre plus aucun avantage mais provoque au contraire détresse et souffrance. Les traitements disponibles ne sont souvent que partiellement efficaces et peuvent s'accompagner d'effets secondaires. Il faut donc explorer de nouvelles voies pour traiter ces douleurs chroniques, et pour ce faire, disséquer leurs mécanismes.

Une douleur chronique n'est pas une simple réponse passive à une altération tissulaire mais constitue un phénomène actif impliquant des changements fonctionnels, ou plasticité, en divers points du système nerveux, périphérique et central. De plus, il n'existe pas une mais des douleurs. Les douleurs chroniques, inflammatoires ou neuropathiques, se manifestent par plusieurs symptômes : douleurs spontanées, continues ou paroxystiques, et douleurs provoquées par des stimulations normalement douloureuses (exagération de la douleur ou hyperalgésie) ou non (allodynie). Chacun de ces symptômes dépend de mécanismes distincts.

L'allodynie mécanique (douleur au toucher) est un symptôme douloureux très fréquent, rencontré chez 20-50% des patients neuropathiques et 60-80% des migraineux chroniques. Elle est due à des changements fonctionnels dans plusieurs régions du système nerveux, notamment dans le cortex sensorimoteur primaire (S1). S1 code pour la localisation, l'intensité et la durée de la sensation douloureuse. On a récemment démontré que chez l'animal inflammatoire chronique, S1 est le siège d'une activité neuronale accrue. Or, réduire (pharmacologiquement) l'activité de S1 diminue l'allodynie mécanique et, au contraire, l'augmenter aggrave cette allodynie. L'activité de S1 paraît donc moduler l'allodynie mécanique. Prévenir toute augmentation de l'activité de S1 pourrait être un nouveau moyen de traiter l'allodynie mécanique. Cependant, quel(s) est(sont) le(s) mécanisme(s) de cette augmentation ?

L'augmentation de l'activité de S1 en conditions douloureuses chroniques serait due, entre autre, à une potentialisation à long-terme (en anglais : 'long-term potentiation' ou LTP) de la transmission synaptique excitatrice sur les cellules pyramidales (neurones principaux) des couches 2-3 de S1. Nous explorerons cette hypothèse dans un modèle standard dans notre laboratoire de douleur inflammatoire chronique chez le rat par injection d'adjuvant complet de Freund dans la lèvre

supérieure. L'intégration de la douleur implique de nombreuses régions du système nerveux. Aucune méthode alternative ne peut remplacer le protocole mis en place.

En vue de l'application de la règle des 3R, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum. Il tient compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests mais reste suffisant pour discriminer un effet statistiquement significatif entre les traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non paramétriques). On ne peut pas substituer une autre préparation à l'animal. En effet, l'apparition de douleurs chroniques résulte de l'activité simultanée de plusieurs aires du cerveau. De plus, l'utilisation d'antalgiques est impossible puisque nous étudions la douleur même. Cependant, il faut noter que l'allodynie mécanique n'est pas une douleur spontanée mais provoquée. Elle n'altère pas le comportement général de l'animal dans les cages à environnement enrichi. De plus, la durée de la mesure du seuil douloureux est la plus courte possible. Au total, 216 rats seront utilisés. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose anesthésique suivie d'une décapitation.

7903 La formation à la chirurgie expérimentale est une obligation réglementaire pour les concepteurs et les réalisateurs de procédures expérimentales incluant des procédures chirurgicales.

Nous avons mis en place une formation rongeur à la chirurgie totalement *ex vivo* ne contenant pas d'animaux mais pour certains utilisateurs, il peut être intéressant de pouvoir compléter cette formation par des séances de chirurgie expérimentale sur animaux vivants (souris) afin d'avoir une expérience analogue à celle dont ils auront besoin par la suite. Les techniques enseignées sont exactement celles dont ont besoin les utilisateurs ou des techniques qui permettent de suturer les grandes cavités.

Nous réduisons donc le nombre d'animaux proposant une formation diplômante uniquement *ex vivo* et en ne proposant cette formation complémentaire uniquement aux utilisateurs intéressés.

Nous remplaçons en utilisant lors de la formation diplômante des TP *ex vivo* (ex : peau artificielle silicone pour les TP suture)

Enfin nous raffinons les techniques en utilisant uniquement des animaux issus d'élevages destinés à l'euthanasie, en utilisant systématiquement des procédures sans réveil dans lesquelles les animaux sont anesthésiés (générale + locale) et analgésiés (analgésiques centraux), mis sur tapis chauffants.

Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 300 souris maximum

7904 L'évolution des systèmes d'élevage liée, d'une part, à la demande sociétale pour des systèmes de production plus durables et respectueux du bien-être animal et, d'autre part, aux changements climatiques va nécessiter l'adaptation des techniques d'élevage à des situations environnementales fluctuantes et de plus en plus diversifiées. Elle va aussi solliciter les capacités d'adaptation (robustesse) des animaux. De plus, les pressions économiques ont entraîné les producteurs vers des systèmes de pilotage simplifiés (pour réduire les coûts) dans lesquels l'attention portée aux individus est diminuée. Une composante clé pour réussir dans ces conditions réside dans une bonne harmonie entre les capacités d'adaptation des animaux du troupeau, leur performance de production et un pilotage par l'éleveur qui valorise au mieux leur variabilité biologique individuelle. La connaissance individuelle des animaux (notamment de leur personnalité, c'est à dire des traits tels que l'agressivité, l'activité, l'exploration, la prise de risque, la peur et la réactivité émotionnelle résultant à la fois de la génétique et de l'expérience) permettrait également de choisir les individus les plus adaptés aux nouvelles méthodes de gestion de l'élevage choisies par l'éleveur. Des mesures préliminaires ont montré, qu'à l'âge adulte et pour un même régime, les chèvres présentaient une variabilité individuelle importante du comportement alimentaire (répartition des repas dans la journée, vitesse d'ingestion...) et du comportement d'abreuvement (fréquence et durée des buvées) pouvant traduire des capacités d'adaptation différentes.

En utilisant des animaux hébergés en groupe et la chèvre comme espèce modèle, ce projet aura comme objectif de caractériser les chèvres, dès leur plus jeune âge puis tout au long de leur vie, sur un grand nombre de critères susceptibles de pouvoir expliquer leurs capacités d'adaptation à des conditions d'élevage changeantes (critères comportementaux tels que leur comportement alimentaire et leur personnalité, critères de production et critères physiologiques). Les animaux seront ensuite soumis à des challenges nutritionnels ou sociaux de court et de moyen terme à plusieurs âges et stades physiologiques (gestation et/ou lactation) pour tester leurs capacités d'adaptation.

D'une durée de trois ans, ce projet contribuera à notre connaissance sur le comportement alimentaire d'un individu, ses facteurs de variation et sa relation avec la production de l'animal. Cela permettra de prendre en compte la caractérisation de l'animal dans les décisions de gestion des élevages.

Le recours à l'animal est obligatoire pour étudier le comportement alimentaire et les capacités d'adaptation. L'objectif est à long terme de pouvoir caractériser tous les animaux de l'installation expérimentale, dès leur plus jeune âge, sur des critères multiples (zootecniques, physiologiques, comportementaux ...) et de suivre l'évolution au cours du temps des caractères mesurés.

Chaque année, entre 70 et 90 chevrettes qui naissent à l'installation expérimentale sont susceptibles d'être conservées pour le renouvellement du troupeau. Le comportement alimentaire pré-sevrage de ces chevrettes sera mesuré grâce à un distributeur automatique de lait. Parmi ces chevrettes, 45 au maximum seront sélectionnées chaque année pour être mises à la reproduction à l'âge de 9 mois. Les 45 chevrettes sélectionnées seront ensuite testées à différentes périodes de l'année. Un même individu sera donc testé plusieurs fois. Le nombre d'animaux a été choisi en prenant en compte le fait que des problèmes peuvent arriver naturellement lors de la première année de vie d'une chevrete (mort prématurée, non réussite à la reproduction, problème lors de la mise-bas, problèmes sanitaires etc.) et que, cette étude portant sur du long terme, il faut un nombre suffisant d'individus dès le début du projet pour être certain d'avoir un nombre statistiquement suffisant en fin de projet, mais nous avons également tenu compte de la règle de réduction des 3R. Par conséquent, nous utiliserons 45 chevrettes au maximum par an, soit 225 animaux pour les 5 ans.

Les animaux seront hébergés en groupe, sur paille, sauf pendant les mesures de comportement alimentaire qui seront réalisées dans des cases collectives sur caillebotis pendant des périodes de deux semaines (une semaine d'adaptation suivie d'une semaine de mesure), et pendant les tests comportementaux de personnalité qui seront réalisés pendant un isolement de quelques minutes. Afin de respecter la règle du raffinement des 3R, l'état général des animaux sera contrôlé plusieurs fois par jour et il sera en particulier vérifié que tous les animaux s'alimentent correctement. Le stress léger potentiellement induit par les challenges (nutritionnels ou sociaux) et l'isolement social lors des tests sera de courte durée.

Tous les animaux retourneront dans l'élevage à la fin des procédures et pourront être réutilisés plus tard pour d'autres expérimentations.

7905 Les avancées de la recherche montrent que les injections de vecteurs viraux adéno-associés (AAV) pour transporter et intégrer des gènes d'intérêt dans des parties précises du système nerveux central, en particulier du cerveau, constituent une voie de thérapie pour certaines maladies neurodégénératives, notamment la maladie d'Alzheimer, la maladie de Huntington et les ataxies spinocérébelleuses (SCA). L'objectif du projet est d'évaluer la faisabilité et l'efficacité d'administration de différents AAVs, pour choisir le plus approprié pour une pathologie donnée (Alzheimer, Huntington ou SCA) et pour une administration par voie chirurgicale intracérébrale (IC) dans la zone du cerveau la plus pertinente pour la pathologie considérée.

Pour cette étude, le recours à un modèle animal est indispensable. Il n'existe aujourd'hui aucune méthode alternative de type simulation informatique ou autres méthodes expérimentales qui permette de reproduire la complexité du cerveau et le comportement physiologique d'un organisme vivant en réaction à l'administration d'un vecteur thérapeutique.

Les vecteurs exprimeront des gènes rapporteurs ou des gènes thérapeutiques. Tous les vecteurs AAV et les préparations utilisées seront caractérisés *in vitro* avant leur utilisation chez l'animal.

Différentes espèces seront utilisées :

- dans un premier temps, une espèce rongeur pour valider la faisabilité technique des différentes stratégies (preuve de concept) dans une espèce de petite taille. Cette étape est importante pour valider la technique de transfert de gènes, validations des différents lots produits et pour la mise en place des différentes techniques permettant de vérifier la bonne intégration du gène d'intérêt dans les cellules, sa capacité à déclencher la production en grande quantité de la protéine thérapeutique...

- puis une espèce primate non humain (PNH), uniquement lorsque la preuve de concept aura été obtenue chez le rongeur. Une espèce de taille moyenne est indispensable pour aborder les difficultés de l'administration de volumes importants de vecteur et du ciblage d'organes de taille similaires à

celles de l'homme. Le choix de l'espèce est basé sur son homologie avec l'homme, au niveau des plans anatomique et fonctionnel du SNC et du point de vue immunitaire (tolérance semblable).

Tous les animaux seront nés et élevés en captivité dans des élevages agréés. Le projet proposé limitera le nombre d'animaux au strict minimum (231, soit 27PNH et 204 rongeurs), et veillera à ce qu'ils ne souffrent ni des procédures d'administration des vecteurs AAV, ni de la présence de vecteurs dans leurs organes. Des évaluations cliniques quotidiennes et l'application de critères d'arrêt permettront de veiller au bien-être des animaux.

La réalisation d'études pilotes avec l'espèce PNH permettra de réduire le nombre total d'animaux utilisés sur l'ensemble de l'étude.

Les procédures chirurgicales pour délivrer des vecteurs AAV seront effectuées par un groupe composé de biologistes/ingénieurs spécialistes de la neurochirurgie et un neurochirurgien pédiatrique. Cela garantira la faisabilité/qualité des gestes chirurgicaux, leur efficacité et la maîtrise de l'anesthésie et de l'analgésie. L'utilisation de méthodes non-invasives, en particulier d'imagerie *in vivo* (IRM), renforcera la qualité des interventions et leur efficacité.

7906 Les traitements classiques actuellement utilisés contre le cancer sont la chimiothérapie et la radiothérapie. Bien qu'étant relativement efficaces, ces thérapies ont comme inconvénient majeur d'induire de nombreux effets secondaires. Il est donc nécessaire de développer de nouvelles stratégies plus prometteuses en termes de spécificité et d'efficacité à long terme comme l'immunothérapie antitumorale. La vaccination antitumorale thérapeutique en est un exemple qui consiste à exploiter et amplifier la capacité innée qu'à notre organisme de lutter contre les cancers par l'intermédiaire du système immunitaire. Les vaccins thérapeutiques ont pour avantage d'induire une réaction très spécifique contre les tumeurs contrairement aux traitements classiques. Ils peuvent agir seuls ou être utilisés en complément de la chimiothérapie ou radiothérapie, permettant ainsi de réduire les doses d'agents chimiques et physiques, sources de nombreux effets secondaires pour le patient. De plus, les vaccins activent les cellules du système immunitaire capables de circuler dans l'organisme et permettent la mise en place d'une mémoire immunitaire, ce qui permettrait un contrôle du cancer à long terme, limitant ainsi le risque de récurrence et d'apparition de métastases.

Le but de ce projet de recherche est donc de développer un nouveau type de vaccin antitumoral à base de nanoparticules portant les éléments capables d'activer les cellules immunitaires. Les nanoparticules que nous exploitons sont des vésicules lipidiques de très petite taille (liposomes), permettant le transport d'éléments indispensables pour l'activation des cellules du système immunitaire.

Avant d'évaluer ce type de traitement chez l'Homme, il est nécessaire de réaliser des études dans des modèles dits précliniques, c'est-à-dire sur des animaux de petite taille, dans notre cas chez la souris. Cette étude ne peut pas être réalisée intégralement *in vitro* ou *ex vivo* car la réponse immunitaire est un processus complexe et coordonné entre plusieurs organes situés à des endroits distincts dans l'organisme. Pour cette raison, l'évaluation du potentiel thérapeutique de nos vaccins ainsi que l'étude de leur potentiel à induire une réponse immunitaire se fait obligatoirement *in vivo*. Pour être sûre que nos vaccins s'appliquent au traitement de différents types de cancers chez l'homme, nous allons évaluer leur efficacité contre différents types de tumeurs et étudier la meilleure méthode d'administration.

Ce travail s'effectuera en 2 étapes : 1- Optimisation des formulations vaccinales et sélection des éléments à intégrer au vaccin, 2- Etude des mécanismes d'activation du système immunitaire mis en œuvre pour les 3 vaccins les plus efficaces

Lors de l'étape 1, nous allons comparer différentes compositions vaccinales, où les éléments nécessaires à l'activation du système immunitaire varient. Ces vaccins seront d'abord comparés dans 4 modèles d'étude du système immunitaire chez des souris ne portant pas de tumeurs. Puis, pour déterminer leur efficacité antitumorale, ils seront évalués dans 8 modèles précliniques de cancer, c'est-à-dire des souris portant une tumeur.

A la fin de cette étape, les 3 formulations vaccinales les plus prometteuses, pour chacun des 8 modèles seront sélectionnées et les détails de leur mode d'action analysés au cours de l'étape 2. Nous évaluerons la limite temporelle des traitements c'est-à-dire le délai à l'issue duquel les vaccins restent

efficaces, le but étant bien sûr de comprendre comment augmenter au maximum ce délai. Nous analyserons également l'importance de l'activation de certaines cellules ou molécules immunitaires soit en les éliminant des souris avant la vaccination soit en utilisant des souris déficientes pour ces cellules ou ces molécules, dans le but d'optimiser les éléments à ajouter dans notre vaccin.

Chaque groupe d'animaux sera composé de 8 souris. Au total, 5184 souris seront utilisées lors des 5 ans.

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

- Réduire : Nous n'utiliserons que 8 animaux par groupe, 8 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité interindividuelle. Nous utiliserons un test statistique non paramétrique, le test de Mann-Whitney (variante de wilcoxon), adéquat pour les petits effectifs. De plus, chaque souris sera exploitée pour déterminer à la fois l'impact sur la réponse immunitaire ET l'efficacité antitumorale, limitant ainsi la répétition des expériences.

- Raffiner : Nous allons enrichir l'environnement des animaux et mettre en place un suivi des animaux afin de vérifier quotidiennement s'ils ne montrent pas de signes de souffrance. Les animaux porteurs de tumeurs seront euthanasiés avant d'atteindre le point limite ;

- Remplacer : La réponse immunitaire étant un processus complexe et coordonné mettant en œuvre différentes cellules interagissant dans plusieurs organes de notre corps, il n'est pas possible de reproduire fidèlement ce processus *in vitro* ou *in silico* pour étudier son activité. Pour cette raison, l'évaluation du potentiel thérapeutique de nos vaccins ainsi que l'étude de leur potentiel à induire une réponse immunitaire se fait obligatoirement *in vivo*.

7907 « Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures, de lésions, de traitement anticancéreux par chimiothérapie ou radiothérapie quand le taux de plaquettes circulantes diminue. En dessous de 30 000 plaquettes par μL de sang le risque d'hémorragie interne est important et peut mettre en danger la vie du patient. Afin de circonscrire ce risque, une transfusion de plaquettes obtenues par un don de sang volontaire est souvent nécessaire. Les besoins croissants en dons associés à la faible durée de stockage des plaquettes conduisent fréquemment à des situations de flux tendus et une forte pression sur les réseaux logistiques. Ainsi plusieurs groupes de recherche travaillent sur des méthodes de production *in vitro* de plaquettes fonctionnelles. Actuellement, la production de plaquettes *in vitro* est limitée au laboratoire et son efficacité reste encore très insuffisante pour considérer une production à grande échelle. Cependant, il est nécessaire de caractériser les plaquettes produites tant sur un plan morphologique que fonctionnel avant et après recirculation dans une souris immunodéficiente (appelée NSG) qui tolère les plaquettes humaines.

Il est important dans ces études de tenir compte de la règle des 3R afin d'ajuster au mieux le nombre de souris.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé afin d'obtenir suffisamment d'évènements informatifs et de permettre l'analyse de données statistiquement significatives. Un effectif de 3 expériences indépendantes est prévu afin de pouvoir réaliser un test de student ou une analyse de variance de type anova suivi d'un post test de bonferonni.

Remplacer : Tous les tests de caractérisations des *in vitro* ont été faits. Cependant avant de pouvoir envisager une utilisation chez l'homme, il est absolument nécessaire de s'assurer de leur fonctionnalité *in vivo*. C'est pour cela que le modèle animal est incontournable.

Raffiner : Nous limitons l'utilisation des souris fragiles en utilisant dès que c'est possible des souris C57BL/6J non génétiquement modifiées, plus résistantes.

Afin de limiter le stress, les animaux sont manipulés le moins possible. Leur environnement est optimisé par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, qui leur permettent de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux sont installés par groupes expérimentaux à raison de 2 ou 3 par cage au moment de leur arrivée afin de concilier leurs besoins sociaux et la réduction de la fréquence

des changes avec le stress y afférant. Le groupe ainsi constitué reste identique jusqu'à la fin du projet. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture.

Pour chaque procédure, les animaux seront anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur sera administré. Avant leur réveil, les animaux recevront une injection sous-cutanée de 100µL de sérum physiologique chauffé à 37°C afin de compenser la déshydratation causée par l'anesthésie. Ce projet nécessitera 8 souris C57BL/6J et 216 souris NSG soit 224 souris »

7908 Le purpura thrombopénique immunologique (PTI) est une maladie caractérisée par une diminution du nombre de plaquettes (< 150G/L) et une majoration du risque hémorragique. C'est une pathologie auto-immune qui atteint à la fois patients adultes et pédiatriques. Son incidence varie de 5 à 10 pour 100 000 habitants par an et 4000 hospitalisations/an. Les manifestations cliniques les plus fréquentes sont représentées par des saignements cutanéomuqueux, mais il peut également être responsable d'hémorragies sévères (intra-crâniennes et viscérales) qui, sans prise en charge urgente, peuvent s'avérer mortelles. Le mécanisme physiopathologique demeure peu élucidé, l'hypothèse la plus probable étant une destruction plaquettaire médiée par des autoanticorps anti-plaquettes et une altération de la production des plaquettes sanguines suite à un déséquilibre immunologique.

Eléments figurés du sang, les plaquettes sont des cellules anucléées de 3µm de diamètre, dont le rôle principal est d'assurer l'hémostase primaire en cas de lésion de la paroi vasculaire. Les fonctions des plaquettes sanguines sont assurées par des glycoprotéines de surface qui interagissent avec les éléments de la paroi vasculaire afin de permettre l'arrêt de l'hémorragie.

Dans les cas de PTI, la présence d'anticorps dirigés contre ces glycoprotéines peut être responsables de la destruction accrue des plaquettes et donc de la diminution du nombre de plaquettes circulantes. Cependant, la présence de ces auto-anticorps n'est pas associée à un déficit d'expression de la glycoprotéine cible.

La glycoprotéine VI (GPVI) est un récepteur spécifique de la lignée plaquettaire appartenant à la famille des immunoglobulines. Elle permet l'adhésion des plaquettes au collagène, étape indispensable à l'arrêt du saignement actif. La présence d'auto-anticorps anti-GPVI a été mise en évidence chez des patients présentant un PTI associé à un déficit d'expression de la GPVI à la surface plaquettaire. Cependant, le rôle exact des anticorps anti-GPVI n'a pour le moment pas été identifié ni chez l'homme ni dans aucun modèle animal.

Afin d'évaluer l'effet de l'autoanticorps anti-GPVI sur la production des plaquettes, leur éventuelle destruction et l'expression de la GPVI sur celles-ci, des souris humanisées exprimant la GPVI humaine recevront une injection intraveineuse de plasma ou d'anticorps purifié de patient ayant des anticorps anti-GPVI dans le cadre d'un PTI. La numération plaquettaire des animaux traités sera suivie de manière quotidienne et la moelle osseuse, la rate, les poumons et foie seront prélevés en fin d'expérience afin d'évaluer l'impact du traitement sur la production et la survie des plaquettes.

Dans le but d'obtenir des résultats statistiquement significatifs par analyse du test de Student, un nombre maximal de 44 souris sera nécessaire à la réalisation du projet.

La compréhension de l'effet de ces anticorps sur la lignée plaquettaire permettra d'affiner le diagnostic des malades atteints de PTI associé à la présence d'anticorps anti-GPVI et d'optimiser leur prise en charge globale

Remplacer : Des tests croisés *in vitro* sur des prélèvements sanguins de donateurs volontaires sains ont été effectués afin de mieux comprendre le rôle des anticorps anti-GPVI dans la disparition de l'expression de la protéine membranaire impliquée dans la symptomatologie hémorragique des patients. Cependant, ces explorations reproduisent de façon imparfaite et artificielle les conditions physiologiques et ne permettent pas d'étudier la production plaquettaire qui peut être altérée par action de l'anticorps. Dans la mesure du possible les expériences sur les souris pourront être complétées/remplacées par des tests *in vitro* de culture cellulaire : différenciation de cellules CD34 en mégacaryocytes en présence/absence d'anticorps anti-GPVI et étude de l'impact sur la génération des proplaquettes et des plaquettes dans ce modèle.

Réduire Le nombre d'animaux utilisé sera réduit au maximum, tout en assurant le nombre minimal nécessaire à la production de résultats statistiquement significatifs selon test de Student. (Suivi de la

numération plaquettaire et étude de la présence de la GPVI chez la souris dans les différentes conditions avec ou sans anticorps anti-GPVI)

Raffiner L'environnement des souris sera enrichi avec du coton et de la frisure afin de leur permettre de construire leur nid et retrouver un milieu de vie proche des conditions dans la Nature. Un accès à l'alimentation et l'eau de boisson sera assuré en permanence.

Les prélèvements prévus au cours de l'expérimentation seront effectués sous anesthésie afin de réduire la douleur liée aux gestes appliqués.

7909 En raison de sa fonction de barrière thermorégulatrice et immunitaire, la peau est un organe indispensable à la survie de l'organisme. Lors d'agressions importantes, telles qu'après une brûlure du troisième degré, la peau n'est plus capable de cicatriser spontanément, ce qui peut conduire à la mort du patient brûlé. La prise en charge des victimes de brûlures sévères se base quasi-exclusivement sur l'utilisation de substituts cutanés produits en laboratoire : les Cultures d'Epidermes Autologues (CEA). Utilisées depuis plus de 40 ans, les CEA permettent de reformer efficacement la barrière cutanée. Pourtant, leur prise de greffe, leur fragilité, leur coût et les séquelles esthétiques et fonctionnelles qu'elles engendrent limitent leur utilisation thérapeutique.

Le projet présenté ici vise à améliorer l'efficacité des CEA en les combinant à une nouvelle thérapie par cellules stromales mésenchymateuses de gencive. Nous espérons que ces cellules gingivales amélioreront la prise de greffe des CEA et la qualité de la cicatrisation cutanée en remédiant à l'apparition de cicatrices. Pour mener à bien ce projet, des souris immunodéprimées seront utilisées afin que les CEA d'origine humaine puissent être greffés chez la souris sans être rejetées. Les animaux subiront une excision de peau en zone dorsale afin d'accueillir les CEA et bénéficieront d'injections en sous cutanée de cellules souches ou d'un placebo.

La mise en œuvre de ce projet respecte la règle des 3Rs « Réduction, Raffinement, Remplacement ». A l'aide d'une étude statistique, nous avons réduit le nombre d'animaux à inclure dans cette étude (456 animaux répartis sur 3 ans). Au fur et à mesure du projet, plusieurs critères d'interruption définis en amont viendront ponctuer le déroulement des expérimentations et permettront de raffiner le nombre d'animaux utilisés en fonction des résultats obtenus. L'utilisation d'animaux ne pourra cependant pas être remplacée par des modèles prédictifs étant donné que de tels modèles n'existent pas encore ou ne sont pas suffisamment précis.

Le bien-être des animaux sera assuré par l'utilisation de moyens d'enrichissement du milieu de vie des animaux (abris, jeux à ronger), par une visite quotidienne et par un suivi analgésique avant, pendant et après les chirurgies. Des points limites précoces et précis seront strictement appliqués afin d'éviter toute souffrance animale.

7910 *Escherichia coli* est une entérobactérie le plus souvent responsable d'infections urinaires ou intra-abdominales, que ces infections soient acquises en ville ou à l'hôpital. La diffusion mondiale de souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) responsable d'une résistance aux céphalosporines de troisième génération pose un problème thérapeutique majeur en raison de la multi-résistance de ces souches. Ceci a conduit à une augmentation dramatique de la consommation des carbapénèmes qui restent la classe antibiotique de référence en cas d'infection sévère à entérobactérie productrice de BLSE. En conséquence, l'émergence et la diffusion de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes est devenue une menace mondiale. Cette résistance peut impliquer plusieurs mécanismes : i) association d'une imperméabilité membranaire et/ou d'un efflux et production d'une BLSE ou d'une céphalosporinase ; ii) production de carbapénémase.

Les options thérapeutiques contre les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont souvent limitées. Les conséquences thérapeutiques de cette résistance posent donc un problème de santé publique. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc indispensable.

Le modèle consiste à injecter par voie intra-péritonéale 250 μ l d'un inoculum bactérien de 10⁷ bactéries mélangé dans un rapport 1/1 avec de la mucine porcine afin de créer une infection intra-péritonéale reproduisant les lésions de péritonite chez l'homme. Pour une souche bactérienne donnée et un régime antibiotique donné, 15 souris sont utilisées. Les souris contrôles ne sont pas traitées et

sont sacrifiées 2 heures après l'inoculation bactérienne. Le traitement antibiotique débute 2h après l'inoculation bactérienne et dure 24h. Les souris sont sacrifiées 4h après la dernière injection d'antibiotique (cf. infra). Le liquide péritonéal et la rate sont broyés et étalés sur gélose après dilution pour déterminer les comptes bactériens et détecter l'émergence de souches résistantes.

Le projet consiste à étudier l'impact de différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* et proposer des alternatives aux traitements de référence. Sont notamment étudiés chez les souches produisant une bêta-lactamase à spectre élargi (BLSE) ou une carbapénémase, l'activité soit d'anciens antibiotiques utilisés seuls ou en association tels que la témocilline, la fosfomycine, les carbapénèmes Et la colistine ou de nouveaux antibiotiques tels que l'association ceftolozane-tazobactam afin de proposer des régimes thérapeutiques efficaces en cas d'infection à germe multirésistant.

Le projet expérimental est conforme aux exigences de, réduction, de raffinement et de remplacement (« règle des 3 R »). En effet :

Réduction. Expérimentalement, nous pouvons répondre à la supériorité d'un régime thérapeutique par rapport à un autre avec 15 souris par groupe thérapeutique, grâce aux données bactériologiques quantitatives permettant des tests statistiques adaptés. Cette puissance statistique évite donc des expérimentations animales non concluantes. Chez l'homme, un tel résultat ne pourrait être obtenu qu'après une étude randomisée prospective en double avec plusieurs dizaines ou centaines d'individus par groupe en raison de l'absence de numération possibles des comptes bactériens dans le rein chez l'homme et l'utilisation de critères secondaires beaucoup moins discriminants que ceux utilisés chez l'animal.

Raffinement. Le raffinement est obtenu grâce au respect d'un délai d'au moins 48-72h entre l'arrivée des souris au laboratoire et le début de l'expérimentation animale, le respect des conditions optimales d'hébergement des souris (5 souris par cage), la limitation du nombre de souris traitées simultanément.

Dans la mesure où ce modèle représente un modèle sévère d'infection bactérienne systémique avec septicémie et signes de sepsis à partir de 2h après l'inoculation bactérienne et une mortalité spontanée proche de 100% en 24 h en l'absence de traitement efficace, nous avons établi des points limites les plus précoces possibles : i) délai de 2h uniquement entre l'inoculation bactérienne et le sacrifice des souris contrôles en raison d'une dégradation rapide de l'état clinique des souris entre 2 et 4 h post-inoculation ; ii) début du traitement 2h après l'inoculation bactérienne chez les souris traitées ; iii) sacrifice programmé 4h après la fin du traitement antibiotique qui dure 24 h, sans attendre de décès spontané ; iv) dans la mesure où les souris sont traitées et surveillées toutes les 2 à 4 h pendant les 24h du traitement, les souris sont sacrifiées pendant le traitement, sans attendre la fin du traitement, si leur état clinique se dégrade (torpeur, poil hérissé ...).

Remplacement. La complexité de la physiopathologie de la péritonite bactérienne et la variabilité des concentrations antibiotiques dans le péritoine rendent pour l'instant le remplacement de ce modèle expérimental par des modèles *in vitro* ou *in silico* non réalisable.

La durée du projet est de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est de 360

7911 Le sepsis est défini comme une infection de l'organisme par un agent pathogène, qui conduit à une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital. En s'aggravant, le sepsis peut conduire au choc septique, stade le plus grave de l'infection, qui est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes du sepsis et du choc septique, afin de trouver de nouveaux traitements.

Une des principales caractéristiques du sepsis est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui fait intervenir les globules blancs. Cette hyper-inflammation systémique peut conduire à l'activation de la coagulation du sang et des plaquettes sanguines, à l'origine de thromboses des vaisseaux de la microcirculation, favorisant les défaillances des organes et pouvant conduire au décès. Il a été montré que les bactéries sont capables d'activer directement les plaquettes *in vitro*, notamment via leur interaction avec le récepteur FcγRIIIa, encore appelé CD32A, qui est un

récepteur pour les anticorps IgG. Le CD32A est présent sur les plaquettes humaines, mais absent des plaquettes de souris. Or, la stimulation de ce récepteur entraîne une activation forte des plaquettes humaines, ou des souris transgéniques pour ce récepteur. Il est ainsi légitime de se demander si la présence du CD32A sur les plaquettes de souris pourrait jouer un rôle dans le sepsis et le choc septique.

Ce projet vise à évaluer le rôle du CD32A dans le sepsis et le choc septique à l'aide de souris transgéniques « humanisées », c'est-à-dire exprimant la protéine CD32A d'origine humaine. Ce travail devrait permettre d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces. Il sera réalisé à l'aide d'un modèle de sepsis et de choc septique chez la souris, induit par péritonite.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives (test statistique t-test, one way ou two-way ANOVA, selon les questions posées et les expériences). Ce nombre a été réduit à un lot de 3 souris pour la chirurgie sham et à 10 souris pour la chirurgie CLP. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- Au moins 48h avant la procédure, les animaux sont répartis par groupes et mis dans les cages qu'ils occuperont tout au long du processus. Du gel nutritif est inséré dans la cage afin de familiariser les animaux à ce nouvel aliment qui facilitera la prise de nourriture et l'hydratation après la chirurgie.

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés. En plus de l'anesthésie générale à l'isoflurane, une anesthésie locale est effectuée par injection sous-cutanée de 0,1 mL de lidocaïne (Xylovet ND, forme injectable, 7mg/kg) et de bupivacaïne 0.25%, de part et d'autre de l'endroit où va être faite l'incision cutanée.

- Une analgésie est pratiquée par administration sous-cutanée de Vetergesic® (buprénorphine) à 0.1 mg/kg toutes les 6h et ce, dès la fin de la chirurgie.

- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;

- en fin d'expérience, le sang sera prélevé à l'aorte des animaux anesthésiés, qui seront ensuite mis à mort et différents tissus seront prélevés.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences *in vivo* sur souris seront remplacées par des études *in vitro* sur cellules. A l'issue de ce protocole, une évaluation rétrospective sera réalisée.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 92 souris.

7912 La kératose actinique est une lésion cutanée développée à partir des kératinocytes, cellules constituant 90 % de la couche superficielle de la peau (épiderme), est dont les deux facteurs de risque principaux sont l'exposition solaire avec les rayonnements ultraviolets de type B ou UVB, ainsi qu'une peau sensible, personnes ayant une peau et des yeux clairs, sujets blonds et roux. La meilleure prévention est une protection solaire efficace.

Une kératose actinique se traduit par un épaississement de la couche cornée de l'épiderme aux endroits du corps exposé au soleil pendant une période prolongée et son incidence augmente avec l'âge. Elle est considérée comme précancéreuse et peut évoluer de différentes manières : elle peut se résorber spontanément, persister ou augmenter de volume plus ou moins rapidement. Dans 16 à 20 % des cas, elle peut évoluer vers un cancer cutané.

Différents traitements locaux sont possibles en fonction de la localisation, des caractéristiques du patient et de celles de la kératose actinique : cryothérapie, chirurgie, laser, curetage et électrocoagulation, thérapie photodynamique, gel au diclofenac, à l'ingénol mébutate, crèmes à l'imiquimod ou au 5 Fluorouracil. Cependant les effets indésirables varient en fonction du type de kératose actinique et de la durée des traitements nécessaires.

Le but de ce projet est d'étudier l'efficacité du peptide P9X en traitement préventif à 2 doses sur un modèle de kératose actinique induit par exposition répétée au rayonnement UVB chez la souris femelle Hairless Skh-1. Ce peptide pourrait en effet constituer un nouveau traitement pour lutter contre

cette pathologie cutanée. Les 2 doses utilisées seront déterminées selon les résultats d'un projet précédent au cours duquel nous avons étudié la courbe dose réponse et la cinétique après une ou plusieurs applications du peptide P9X à différentes doses chez la souris femelle Hairless Skh-1.

Nous utiliserons 40 souris femelles Hairless Skh-1 âgées de 6 semaines pour ce projet, réparties sur la base du poids en 4 groupes de traitement (10 souris/groupe) :

- Groupe 1 : traitement avec le véhicule sans induction de kératose actinique,
- Groupe 2 : traitement avec le véhicule et induction de kératose actinique,
- Groupe 3 : traitement avec le peptide P9X à la dose 1 et induction de kératose actinique,
- Groupe 4 : traitement avec le peptide P9X à la dose 2 et induction de kératose actinique.

Une semaine avant le début des traitements, les souris seront tatouées sous anesthésie gazeuse sur le dos afin de suivre l'apparition des lésions cutanées à l'aide d'une caméra digitale au niveau de la même zone cutanée pour chaque souris tout au long de l'expérimentation (Procédure 1). Les traitements seront réalisés quotidiennement pendant 11 semaines dans la matinée par application cutanée de véhicule ou de peptide P9X aux 2 doses à tester au large de la zone tatouée (Procédure 2). Les souris seront irradiées 3 fois par semaine pendant 10 semaines dans l'après-midi, en débutant 1 semaine après le début des traitements, en les plaçant sous un irradiateur générant des UVB pour l'induction ou non de kératose actinique (Procédure 3). Le suivi de développement des lésions cutanées sera réalisé 1 fois par semaine pendant les 11 semaines de l'expérimentation en plaçant les animaux sous anesthésie gazeuse et en utilisant une caméra digitale pour la prise de photos de la zone délimitée par le tatouage (Procédure 4).

A l'issue de l'expérimentation, les animaux seront mis à mort et un prélèvement de peau sera effectué au large de la zone tatouée pour la réalisation d'analyses histologiques et biochimiques.

Les animaux seront placés à 2 par cage pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour réaliser les traitements pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Plusieurs observations quotidiennes avant et après traitement, après irradiation et après anesthésie pour le suivi de développement des lésions cutanées, et des pesées régulières seront effectuées et l'atteinte des points limites définis (perte de poids de plus de 20%, affaiblissement (cachexie), convulsions, tremblements, paralysie, vocalises, brûlures...) entraînera la sortie d'étude et la mise à mort des animaux selon les recommandations éthiques.

Il n'existe pas de modèles *in vitro* permettant d'étudier l'efficacité de composés après des applications répétées sur un organisme entier qui plus est sur une période aussi longue (Remplacement) et nous utiliserons le nombre minimum d'animaux et suffisant pour mettre en évidence des différences significatives dans nos conditions expérimentales (Réduction).

Compte-tenu de l'augmentation constante de l'incidence de la kératose actinique dans la population mondiale, le développement d'un nouveau traitement présente un enjeu socio-économique certain afin de développer des thérapies efficaces contre cette pathologie chez l'Homme.

7913 L'autophagie est un processus cellulaire permettant la dégradation et le recyclage de protéines ou d'organelles. De nombreuses études des différentes maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson, ou d'Alzheimer, ou de Huntington montrent qu'une altération de l'autophagie participe à l'accumulation de protéines anormales et toxiques et ainsi contribue aux processus neurodégénératifs. Le cil primaire (CP) est une organelle cellulaire qui a été identifié comme induisant l'activation de l'autophagie en recrutant des protéines associées. La protéine IFT88 est une des protéines requises pour la ciliogenèse, par contre sa présence pendant l'embryogénèse est indispensable pour le développement de l'embryon. Les modèles murins d'inactivation constitutive du gène pour l'étude de son rôle, sont donc létaux. Il faut avoir recours à des modèles inductibles croisés avec des lignées rapportrices permettant l'inactivation du gène IFT88 de façon ciblée dans l'espace et le temps par injection de Tamoxifène pour induire la perte de cils à différents âges. Notre projet a pour but d'étudier le rôle des CP dans le cerveau adulte et leur implication dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (MA). Les maladies neurodégénératives liées à l'âge comme la MA sont

associées à l'accumulation de protéines toxiques qui interfèrent avec l'autophagie. Nous souhaitons étudier un lien possible entre l'autophagie et accumulation des agrégats bêta-amyloïde (A β) caractéristiques de la MA. Pour ce faire, nous allons caractériser le CP dans l'hippocampe adulte, évaluer sa perte au cours du vieillissement et lors de l'injection de l'A β en espérant pouvoir ouvrir de nouvelles voies thérapeutiques.

Dans le respect du R de remplacer, pour répondre à ces questions, il n'existe pas pour l'heure d'approche *in vitro*. Dans le respect du R de réduire, nous avons étudié au plus près le nombre d'animaux nécessaire pour définir le nombre d'animaux pour obtenir des données statistiquement fiables, ce nombre est 64. Dans le respect du R de raffiner, les souffrances générées par les procédures seront soulagées par des molécules adaptées et des points limites suffisamment prédictifs seront définis. Le bien-être des animaux sera pris en compte à chaque moment de leur vie.

7914 Dans le cadre de l'appel d'offre régional, 3 laboratoires complémentaires clermontois ont réuni leurs compétences autour d'un projet. Ce projet, nommé vise deux objectifs :

1-Déterminer l'influence de différentes modalités d'exercice sur le microbiote intestinal et la masse grasse abdominale afin d'étudier les interrelations intestin/tissu adipeux sur des modèles de pathologies inflammatoires.

2- Approfondir les mécanismes d'action par lesquels l'activité physique conduit à un impact bénéfique à l'échelon tissulaire et les interactions potentielles entre l'intestin, le muscle et le tissu adipeux.

Le protocole proposé s'inscrit dans la règle des 3R pour l'expérimentation animale. Les procédures expérimentales n'induisent peu ou pas de douleur. Le nombre d'animaux nécessaire est de 240 rats Zucker, de 230 souris sauvages traitées au DSS et de 230 souris CEABAC10 sous régime HF + AIEC LF82 soit un total de 700 animaux.

L'activité physique consiste en une course sur tapis roulant à deux intensités et durées différentes, 5 jours par semaine pendant 10 semaines ou en roue libre.

Ainsi, le projet inclut un maximum de 14 groupes de 20 animaux et 14 groupes de 30 animaux :

Pour le rat :

1/Entraînement HIIT

2/Entraînement MICT

3/Contrôle perfed HIIT

4/Contrôle perfed MICT

5/Contrôle ad libitum

6/Zucker lean contrôle

7/Injection chronique NRG1

8/Contrôle injection chronique serum physiologique

9/Injection aigue NRG1

10/Contrôle injection aigue serum physiologique

Pour les souris CEABAC10 sous régime HF +AIEC LF82 :

11/Entraînement HIIT

12/Entraînement MICT

13/Entraînement roue 3j/semaine

14/Entraînement roue 7j/semaine

15/Contrôle

16/Injection chronique NRG1 ou minipompe

17/Contrôle injection chronique serum physiologique ou minipompe

18/Injection aigue NRG1

19/Contrôle injection aigue serum physiologique

Pour la souris sauvage traitée au DSS :

20/Entraînement HIIT

21/Entraînement MICT

22/Entraînement roue 3j/semaine

23/Entraînement roue 7j/semaine

24/Groupe contrôle

25/Injection chronique NRG1 ou mini pompe

26/Contrôle injection chronique sérum physiologique ou mini pompe 27/Injection aigue NRG1

28/Contrôle injection aigue sérum physiologique

Le modèle de rat Zucker est particulièrement bien adapté à l'étude des paramètres associés à l'obésité. De plus, le rat est un modèle reflétant des adaptations similaires sur le plan de l'activité physique à l'humain suite à un entraînement sur tapis roulant.

Les études cliniques, épidémiologiques et expérimentales suggèrent que la MC serait une dérégulation de la réponse immunitaire innée en réponse à un stimulus bactérien chez un hôte génétiquement prédisposé. Le modèle de souris utilisé ici présente une surexpression du récepteur humain CEACAM6 permettant l'adhésion de la souche AIEC LF82. Il en résulte le développement d'une inflammation intestinale similaire à celle observée chez des patients atteints de la MC.

Une colite peut aussi être déclenchée par l'administration d'un composé chimique toxique, le sulfate de dextrane sodique (DSS). Après administration via l'eau de boisson, l'activation du système immunitaire intestinal et le recrutement dans l'intestin de cellules inflammatoires concourent à entretenir l'inflammation et les lésions intestinales similaires à celles observées dans la MC.

Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme de l'obésité et la MC sont peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*.

Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, test de tolérance aux glucides et à l'insuline, injections de NRG1) sont pour la plupart non invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Seule une étape du projet implique la détention des rats Zucker uniquement en cages calorimétriques pendant une durée de 48h en fin de protocole.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le(s) même(s) modèle(s), un minimum de 20 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif. Pour les groupes concernés par les protocoles d'activité physique chronique, étant donné le fait que de nombreux animaux sont réfractaires à la réalisation du protocole, une sélection préalable des "réfractaires" et des "non réfractaires" sera réalisée. Ainsi, 30 animaux sont prévus au départ dans ces groupes, nombre qui sera ramené à 20 après sélection des animaux qui ne sont pas réfractaires à la réalisation du protocole. Les animaux non utilisés pour l'objectif principal en raison de la non-sélection dans les protocoles d'activité physique (40 Zucker, 50 souris CEABAC10 sous régime HF +AIEC LF82, 50 souris sauvages C57BL/6 traitées au DSS) seront euthanasiés sans procédure supplémentaire. Leurs tissus seront prélevés et conservés afin d'étudier les différences phénotypiques à l'échelon tissulaire en comparaison aux animaux sélectionnés pour rentrer dans le protocole d'activité physique.

7915 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de vaccins thérapeutiques anti-cytokine, et ciblant notamment l'interféron-alpha. Le candidat vaccin, appelé kinoïde, qui cible l'interféron-alpha est ainsi noté IFN-kinoïde (ou IFN-K). Les cytokines sont des protéines naturelles qui orchestrent certaines réponses immunitaires et inflammatoires. Certaines pathologies auto-immunes, inflammatoires ou

cancéreuses se déclenchent ou se développent à cause de la surexpression de cytokines. Le mécanisme d'action des kinoïdes repose sur la production par le système immunitaire du patient d'anticorps anti-cytokine, après administration de ce kinoïde. L'administration est réalisée sous forme d'émulsion avec un adjuvant de type huileux qui induit une réponse naturelle d'anticorps polyclonaux capable de neutraliser l'activité biologique de la cytokine cible.

Des travaux scientifiques relatent ainsi la surexpression de la cytokine interféron-alpha dans le diabète de type I. Cela nous a conduits à tester l'approche kinoïde dans cette pathologie. L'implication de l'interféron-alpha dans le diabète de type I serait précoce, nous avons donc envisagé d'étudier l'influence d'un transfert passif des anticorps maternels sur l'incidence du diabète chez les descendants.

Les souris de l'espèce NOD sont classiquement utilisées pour l'étude du diabète de type I, car elles développent spontanément la pathologie au bout de quelques semaines d'âge. L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire ne peut se faire que sur animaux vivants.

Dans notre projet, nous prévoyons d'inclure trois groupes de souris NOD femelles :

- traitées par le kinoïde IFN-K + adjuvant
- traitées par un composé contrôle (protéine porteuse faisant partie des composés du kinoïde) : KLH + adjuvant
- non traitées = groupe sentinelle

La stimulation du système immunitaire des souris NOD sera évaluée en quantifiant les anticorps anti-IFN générés au cours du protocole d'immunisation. Afin d'évaluer la protection contre le diabète de type I conférée aux descendants par l'immunisation de leurs mères, les souris NOD femelles immunisées seront accouplées à des souris NOD mâles. Nous étudierons ensuite chez les descendants femelles différentes caractéristiques associées au développement de la pathologie du diabète de type I.

En accord avec les exigences de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux par groupe sera limité, afin de conférer aux groupes étudiés une puissance statistique satisfaisante pour ce protocole expérimental.

Nos calculs nous permettent d'estimer à environ 324 souris NOD utilisées dans ce projet, par an : $324 = 90$ souris femelles + 45 souris mâles + 189 descendants femelles (en estimant qu'il y aura 60% de femelles pour lesquelles la reproduction est effective, un nombre de 7 descendants pour chacune des femelles se reproduisant, et en supposant que les portées comprennent 50% de mâles et 50% de femelles). Un total de $324 \times 5 = 1620$ animaux couvriront donc les 5 années du projet.

Dans ce protocole au cours duquel les souris NOD vont spontanément développer le diabète de type I, une attention et un suivi particulier seront apportés aux animaux : le suivi sera réalisé quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Un apport toujours suffisant en eau et alimentation sera réalisé pour les animaux, par rapport à leur consommation associée au développement du diabète. Les points limites seront évalués de manière à éviter toute détresse ou souffrance des animaux inclus dans le protocole. En particulier, le poids des animaux sera suivi régulièrement (à l'arrivée des animaux, après un mois et toutes les semaines dès la survenue du diabète), de façon à détecter une éventuelle perte de poids associée à la pathologie. Les animaux détectés en souffrance seront euthanasiés.

7916 Certaines moisissures produisent des molécules toxiques appelées mycotoxines qui peuvent contaminer les aliments (légumes, fruits et céréales). Ces mycotoxines sont très résistantes durant le stockage et la préparation des aliments. Les mycotoxines produites par les *Fusarium* (fusariotoxines) contaminent principalement les céréales. Parmi elles, la fumonisine B1 (FB1) est très présente en Europe particulièrement dans le maïs. Un des effets délétères de cette mycotoxine implique le métabolisme lipidique et engendre des effets toxiques chez les animaux comme une atteinte du système hépatique ou rénal. Chez l'homme, cette toxine est considérée comme un facteur de risque pour le cancer œsophagien. La contamination des aliments par cette mycotoxine représente donc un risque pour la santé humaine et animale.

L'objectif de cette étude est de caractériser la toxicité de la FB1 et son impact sur le métabolisme lipidique pour trouver de nouvelles stratégies alimentaires capables de contrôler la toxicité de ces molécules, résistantes aux traitements de détoxification déjà existants. Des résultats préliminaires montrent que l'enrichissement de régimes alimentaires en lipides peut moduler la toxicité de la FB1. Cependant, aucune étude *in vitro* ni *ex vivo* ne permet à ce jour d'étudier les voies métaboliques impliquées dans la toxicité de la FB1 ni l'impact de régimes alimentaires enrichis en lipides sur la fumonisine B1. L'étude du métabolisme lipidique ainsi que l'impact de ces régimes alimentaires sur la toxicité de la FB1 nécessite l'utilisation d'animaux vivants. Le porc, ayant une alimentation riche en céréales et par conséquent subissant une exposition naturelle à la FB1, fait partie des espèces animales les plus exposées et les plus sensibles à cette mycotoxine. A forte dose, elle entraîne des problèmes pulmonaires et cardiaques. Notre étude visant à identifier des régimes alimentaires pouvant réduire la toxicité de la FB1 sur des porcs, pourra permettre une possible utilisation de ces régimes spécifiques dans l'élevage de porcs afin de réduire les effets délétères d'une exposition chronique de ces animaux à la FB1. Pour cela, notre étude se composera de 80 porcelets répartis en 4 groupes. Ce nombre d'animaux est nécessaire pour obtenir des résultats fiables et représentatifs et prendre en compte la variabilité individuelle des animaux. Les animaux exposés à la mycotoxine recevront pendant 4 semaines une dose de FB1 représentative d'un niveau de contamination de terrain et connue pour n'engendrer aucun effet délétère majeur chez les animaux. Les animaux seront suivis au quotidien pour palier à toute éventuel inconfort.

Des prélèvements sanguins seront effectués sur la veine jugulaire de façon hebdomadaire et seront destinés à mesurer différents paramètres biologiques. Des prélèvements urinaires et de fèces seront également effectués pour identifier certains marqueurs biologiques. Les organes seront également prélevés après euthanasie des animaux et permettront l'étude de la toxicité de la FB1.

7917 Le but est d'étudier au niveau préclinique le métabolisme énergétique des souris par un outil non-invasif et complètement automatisé. Ceci ne peut se faire que sur un modèle vivant, car les animaux doivent être vigiles.

Pour cela nous utilisons une plateforme d'analyse physiologique fonctionnelle, qui est composée de 12 cages et permet une mesure en temps réel et pour chaque animal de :

- la prise alimentaire et hydrique
- la mesure de la consommation d'oxygène
- la production de dioxyde de carbone
- la mesure du quotient respiratoire (indicatif de la nature du métabolisme glycolytique ou oxydatif)
- la dépense énergétique globale de l'animal issue de l'activité locomotrice, la thermogénèse et le métabolisme de base.
- l'activité locomotrice spontanée et la mesure fine des déplacements dans les 3 dimensions spatiales (X, Y, Z).

La plateforme permet aussi l'analyse non-invasive de la composition corporelle des rongeurs par un scanner. Ce système, rapide, ne requiert pas d'anesthésie et permet de déterminer la masse maigre, la masse grasse, les fluides corporels et la composition totale en eau chez l'animal.

Cette étude s'inscrit dans le cadre de collaborations qui auront été préalablement validé par des comités éthique locaux aux équipes voulant collaborer avec nous pour connaître les comportements métaboliques sans douleur et en limitant le stress des animaux.

Lors de ces études la règle des trois R sera respectée et nous réduirons au maximum le nombre d'animaux par étude et nous raffinerons les procédures.

Chaque étude collaborative (un maximum de 30 par an) sera réalisée sur 12 souris, soit un total de 1800 animaux sur 5 ans (360 animaux par an maximum).

7918 Dans le contexte mondial de progression "épidémique" du diabète de type 2 et de ses morbidités associées, la mesure de la sensibilité à l'insuline dans une perspective clinique, mais aussi de recherche, revêt une importance particulière. Pour cela une technique de Clamp euglycémique

hyperinsulinémique, a été mise au point afin de déterminer cette sensibilité à l'insuline et l'absorption ou la production du glucose par les tissus cibles.

En effet, le but du clamp euglycémique hyperinsulinémique est de mesurer l'action de l'insuline sur les flux de glucose dans divers tissus.

Lors de cette perfusion d'insuline, la glycémie de l'animal (taux de glucose dans le sang) va diminuer, mais pour pouvoir mesurer les effets métaboliques nous devons perfuser en parallèle une solution de glucose afin de maintenir cette glycémie à l'équilibre (l'euglycémie).

Cette étude s'inscrit dans le cadre de collaboration qui auront été préalablement validé par des comités éthique locaux aux équipes voulant collaborer avec nous pour connaître les comportements métaboliques de leurs animaux. Nous ferons 4 études collaboratives de 20 animaux (10 animaux contrôles et 10 animaux traités) par an, soit 400 souris sur 5 ans.

Lors de ces études la règle des trois R sera respectée, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux par étude et nous raffinerons les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Nous effectuerons l'administration d'analgésique lors des procédures. Et pour poursuivre l'antalgie en post opératoire, un anti-inflammatoire est injecté ainsi que le jour suivant l'opération si nécessaire. Les cages individuelles sont agrémentées d'un nid végétal et quelques croquettes sont mises à même le sol pour éviter les douleurs de tension au niveau de la suture les deux premiers jours après tout est cicatrisé. Cette étude ne peut être effectuée que sur un organisme entier.

7919 L'accident vasculaire cérébral (AVC) constitue la première cause de handicap acquis chez l'adulte, la deuxième cause de démence et la troisième cause de mortalité : c'est un enjeu majeur de santé publique. Dans 85% des cas, l'AVC est d'origine ischémique (privant les tissus d'apport d'oxygène), suite à une occlusion artérielle aiguë. La prise en charge de l'AVC est en pleine évolution grâce aux interventions neuro-vasculaires (NRI), ou thrombectomie, permettant de retirer le thrombus obstruant l'artère. La reperfusion du tissu ischémié s'accompagne d'atteintes lésionnelles spécifiques dites d'ischémie-reperfusion (IR), très similaires à ce qui est observé dans l'infarctus du myocarde. Le diagnostic et la localisation des lésions sont effectués grâce à l'imagerie cérébrale.

Notre laboratoire travaille depuis de nombreuses années sur ces mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus (tissus morts) et les nouvelles pistes thérapeutiques associées. Nous proposons de développer ici sur 2 ans un modèle d'IR cérébrale chez le lapin (New Zealand White de 4kg) et son suivi en imagerie *in-vivo*. L'objectif de l'étude est de valider la fiabilité de ce modèle et donc son utilisation lors de futures études précliniques (test de nouvelles thérapeutiques encourageantes). La phase d'essai thérapeutique de cette étude a d'ailleurs pour but de préciser l'effet neuro-protecteur de la ciclosporine A par des méthodes d'imagerie pour, à terme, optimiser son utilisation en clinique. Le modèle mini-invasif d'ischémie cérébrale transitoire de 30 minutes proposé ici consiste à occlure l'artère cérébrale moyenne à l'aide d'un cathéter inséré dans l'artère fémorale (patte postérieure) et remonté jusqu'au cerveau sous contrôle d'imagerie, réduisant ainsi au maximum l'impact chirurgical pour l'animal (raffinement). L'intervention est réalisée sous anesthésie générale et analgésie adaptée et l'animal n'est pas réveillé après l'intervention, assurant ainsi l'absence de toute souffrance, douleur ou angoisse per et post-opératoire (raffinement).

Les modalités d'imagerie seront les mêmes que celles utilisées chez l'homme : imagerie par résonance magnétique (IRM) et tomographie par émission de positons (TEP). L'imagerie *in-vivo* multimodale (TEP/IRM) permettra un suivi dynamique de la fonctionnalité de la barrière hémato-encéphalique (BHE) et des lésions tissulaires pour tester de nouvelles stratégies thérapeutiques modulant ces processus.

L'imagerie *in-vivo* sous anesthésie gazeuse permet à chaque animal d'être son propre contrôle et limite le nombre d'animaux (Réduction). Les agents de contraste utilisés permettent de visualiser et mesurer le phénomène d'intérêt (perméabilité, inflammation), et sont d'abord testés dans un modèle *in-vitro* (co-culture de cellules mimétiques de la BHE soumises à une privation temporaire en glucose et en oxygène) (Remplacement).

Après une analyse statistique basée sur des résultats de la littérature et d'études antérieures, l'effectif nécessaire à l'obtention de résultats fiables s'élève à 34 animaux. Ce projet permettra ainsi dans un

premier temps (phase pilote n=10) de standardiser la procédure endo-vasculaire et dans un deuxième temps (phase d'essai thérapeutique randomisé en double aveugle n=24) d'étudier l'effet protecteur de la ciclosporine A sur la taille de lésions irréversibles mesurées en IRM de diffusion. Les résultats de la phase pilote conditionnent la réalisation de la phase d'essai thérapeutique (réduction).

En fin d'expérimentation, le prélèvement du cerveau (puis conservation) ainsi que d'autres tissus est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements.

7920 Les neurocristopathies forment un groupe hétérogène de maladies liées à des anomalies de différenciation, migration, survie cellulaires des cellules issues des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales sont issues du tube neural de l'embryon (future moelle épinière) et elles sont à l'origine de nombreux dérivés comme le système nerveux périphérique et les mélanocytes (cellules responsables de la pigmentation de la peau). Les signes cliniques de ces neurocristopathies sont multiples : malformations de la face, retard mental, surdité, malformation des yeux, défauts de pigmentation. Les principales neurocristopathies sont le syndrome CHARGE, le syndrome de Treacher Collins, le syndrome de Waardenburg et le syndrome de DiGeorge.

Notre équipe travaille sur un médiateur cytoplasmique dont nous avons antérieurement montré le rôle essentiel pour la formation de la tête des vertébrés. Son absence conduit à des malformations craniofaciales sévères et d'autres manifestations cliniques qui permettent de dresser un tableau très proche des neurocristopathies humaines. Ce médiateur est essentiel à la différenciation et la survie de ces cellules issues des crêtes neurales.

De nombreuses publications tendent à montrer que, bien que ces maladies aient des origines génétiques diverses, leur sévérité est fortement modulable par une modification du niveau d'activité d'un gène suppresseur de tumeur majeur.

Nous souhaitons tester l'hypothèse suivante : "les caractéristiques cliniques de notre modèle, très proches des neurocristopathies humaines, sont modulables par l'altération de l'activité de ce gène suppresseur de tumeur". Nous renforcerons ainsi notre hypothèse sur le rôle des dysfonctionnements de notre médiateur dans le développement de ce type de pathologie. Nous étudierons aussi les interactions très peu connues entre notre médiateur et ce gène suppresseur de tumeur.

Nous disposons déjà des souris dont l'inactivation du gène de notre médiateur est conditionnée au stade de développement embryonnaire correspondant au début de la migration des cellules des crêtes neurales.

Nous souhaiterions les croiser avec des souris ayant une des deux copies du gène suppresseur de tumeur inactivée. Nous aurons alors à notre disposition la lignée de souris qui nous permettra de commencer notre étude.

La lignée obtenue aura un phénotype dommageable uniquement à cause de l'absence d'une copie de ce gène suppresseur de tumeur. Les souris développeront spontanément des tumeurs variées entre le 4 et le 6 mois après leur naissance.

Raffinement-Réduction : Nous axerons l'entretien de cette lignée sur l'optimisation des générations pour que les souris ne développent pas de tumeur. Nous préleverons sur la population les animaux dont nous avons besoin sans avoir besoin d'accroître la production inhérente au maintien de la lignée. En effet ces animaux entreront dans un autre protocole de croisement permettant l'inactivation conditionnée de notre médiateur. Il s'agit donc uniquement de prélever quelques individus reproducteurs.

Pour établir la lignée il faudra 128 animaux et pour maintenir la lignée sur 5 ans 288 animaux. Il faudra donc 416 animaux.

7921 L'ensemble de ces expérimentations s'inscrit dans la formation d'étudiants ingénieurs en génie biologique de second cycle. L'objectif de ces études est de compléter les cours détaillés sur les grands principes de régulation des fonctions physiologiques avec le concept de régulation *in vivo*. A l'issue de cet enseignement, l'étudiant sera donc capable de définir les principaux mécanismes physiologiques et de dialoguer avec les acteurs du monde médical.

Il est essentiel de former ces futurs ingénieurs en génie biologique aux conditions réelles et à l'observation de gestes techniques non simulés comme la pose de canule et cathéter, afin de les préparer et les rendre plus performant dans leurs futurs domaines de compétence. Cette formation a également pour but de confronter les étudiants à l'expérimentation animale et de les sensibiliser au bien-être animal et plus particulièrement sur la notion des 3 Rs (réduction, remplacement, raffinement)

Dans le cadre de ces travaux pratiques ces 3 points ont servi de piliers afin de construire des procédures les plus éthiques possibles.

(1) Réduction

Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au plus faible possible (Réduction) tout en permettant à chaque participant de pouvoir réaliser dans de bonnes conditions les techniques expérimentales sous le contrôle d'un enseignant formé à l'expérimentation animale. Ces travaux pratiques se divisent en 2 ateliers :

1- Etude de la régulation de la respiration et de la pression artérielle.

2 rats par séances à raison de 4 séances par an soit en moyenne 8 rats/an, ce nombre est augmenté de 2 pour tenir compte d'une éventuelle variation des effectifs des étudiants (soit 10 rats/an total).

2- Activité contractile et le contrôle du muscle lisse.

1 rate par séance à raison de 4 séances par an soit en moyenne 4 rates/an.

Sur les 5 ans, nous utiliserons : 14x5 rats soit 70 animaux.

(2) Remplacement

Les méthodes alternatives (remplacement) comme les modèles numériques ont servi de support pour les cours mais ne permettent pas de former les étudiants à certains gestes techniques comme l'anesthésie c'est pourquoi il est essentiel de les former aux conditions réelles et non simulées.

(3) Raffinement

Les animaux sont commandés une semaine avant le début du travaux pratique. Dès leurs réceptions les rats sont examinés puis stabulés en cages ventilées (nourriture et boisson à volonté) avec un environnement enrichi et un change régulier. Leur bien être étant une priorité une visite quotidienne est effectuée afin de garantir les conditions optimums.

Le jour précédant l'expérimentation, les animaux sont mis à jeun. Le jour de l'expérimentation, un l'enseignant ou un personnel qualifié, isole les rats puis les anesthésies individuellement par une injection intra-péritonéale d'un mélange de xylazine (10 mg/kg) et kétamine (80 mg/kg). Une fois l'anesthésie profonde constatée les animaux sont amenés en salle de TP où l'enseignant procédera aux gestes techniques (pose de canule et cathéter pour l'atelier 1 et prélèvements de l'utérus et de l'intestin pour atelier 2). Les étudiants sont alors autorisés sous surveillance constante à procéder aux différentes expérimentations. Pendant tout la durée de l'expérimentation l'enseignant veillera au maintien de l'anesthésie par des doses de maintien (1/2 dose par rapport à l'induction) à intervalles réguliers de 30 minutes mais également au bon déroulement de l'expérimentation

7922 La Nanotechnologie a ouvert des perspectives prometteuses en médecine, notamment dans la lutte contre le cancer. Actuellement, des nanoparticules d'or (plasmoniques) et des nanoparticules d'oxyde de fer (magnétiques) sont les premiers candidats pour le développement de nouvelles nano-thérapies thermiques. L'excitation par un laser des nanoparticules d'or provoque un échauffement très localisé qui peut détruire les cellules cancéreuses environnantes. Dans le cas de nanoparticules magnétiques, l'application d'un champ magnétique alternatif induit la libération d'énergie sous forme de chaleur. Cependant, bien que l'objectif ultime de ces traitements soit la cellule tumorale, l'efficacité de chauffage, et les mécanismes sous-jacents, sont rarement étudiés dans l'environnement cellulaire. Ici, nous envisageons de combler cette lacune en faisant mesures systématiques de l'hyperthermie magnétique aussi combinée avec l'hyperthermie plasmonique dans des environnements cellulaires contrôlés, en utilisant une large gamme de nanomatériaux individuels et assemblés (nanohybrides) de différents taille, forme et composition. L'objectif final est d'évaluer les nanomatériaux et nanohybrides de meilleur potentiel thérapeutique et de démontrer *in vivo* la puissance de cette

approche (individuelle et combinée) pour le traitement du cancer. Un total de 776 animaux seront utilisés pour la réalisation de ce projet sur cinq ans : 24 matériaux (magnétiques/ plasmonique/ hybrides de différentes caractéristiques et formes) le plus prometteurs et efficaces pour chaque thérapie, seront évalués (24 souris par matériau). Les résultats seront comparés à ceux obtenus par des thérapies anti-tumorales déjà utilisées en clinique : chimiothérapie et photothérapie dynamique. Il y aura donc 5 groupes de 20 souris (à différentes doses d'agent thérapeutique) par chacune de ces deux thérapies. La procédure de ces expériences *in vivo* sera guidée par les principes de réduction, raffinement et remplacement des animaux. Les mesures de remplacement de l'animal seront effectuées par des techniques *in vitro* dans les stades très préliminaires de recherche. L'utilisation des groupes contrôle communs (entre les études d'hyperthermie et les études sur l'effet de la chimiothérapie et de la photothérapie dynamique) sera adoptée en vue de la réduction du nombre total d'animaux utilisés. Afin de réduire la douleur et la détresse des animaux, l'administration d'anesthésiques par voie intraveineuse sera pratiquée avant chaque traitement (raffinement).

7923 La caractérisation des premiers animaux résultant d'une invalidation complète de l'enzyme NAPE-PLD, a ouvert des voies concernant son implication dans les voies métaboliques. Notre étude portera sur l'élimination de cette enzyme, qui est responsable de la synthèse de molécules lipidique bioactives, spécifiquement dans certaines zones du cerveau. Ceci devrait abolir la synthèse de composés lipidiques spécifiques et conduire à la perturbation locale du système endocannabinoïde. Des phénomènes de motivation à recevoir des récompenses, de comportement de préférence de place, de choix alimentaire ou encore de calorimétrie seront analysés au moyen de différents tests. Cette étude ne peut être remplacée par d'autre moyen, comme la culture cellulaire, car nous regardons le comportement de l'animal. Ce projet utilisera le minimum de souris nécessaire (5 groupes de 16 souris (8 contrôles et 8 traitées) par étude et 6 études au total ; soit 480 souris sur les 5 ans de projet) et respectera le bien-être animal. Lors de ces études la règle des trois R sera respectée, nous réduirons au maximum le nombre d'animaux par étude et nous raffinerons les procédures pour réduire au minimum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux. Nous effectuerons l'administration d'analgésique lors des procédures. Et pour poursuivre l'antalgie en post opératoire, un anti-inflammatoire est injecté ainsi que le jour suivant l'opération si nécessaire. Les cages individuelles sont agrémentées d'un nid végétal et quelques croquettes sont mises à même le sol pour éviter les douleurs de tension au niveau de la suture les deux premiers jours après tout est cicatrisé.

7924 De nombreuses avancées ont été faites dans le développement des thérapies ciblées sur les voies de signalisations cellulaires mais le taux de succès de ces nouveaux traitements lors des essais cliniques reste inférieur à 5%. La difficulté à valider ces nouvelles thérapies s'explique par l'absence de modèle préclinique en recherche oncologique. En effet, la plupart du temps, ces modèles précliniques utilisent des lignées cellulaires, leur nombre est limité et leur mise en culture pendant des années est probablement à l'origine de modifications génétiques expliquant leur manque de fiabilité. Les modèles *in vivo* de RCC ont été longtemps limités à des xénogreffes dérivant de ces lignées cellulaires et la plupart des études précliniques d'efficacité thérapeutique sont faites à partir de ces modèles, ne permettant pas de prédire des résultats oncologiques obtenus en recherche clinique. De plus, les lignées cellulaires les plus utilisées ne donnent généralement pas de développement métastatique, empêchant l'étude des carcinomes avancés, indication usuelle des nouveaux traitements systémiques.

Les greffes de tissu tumoral dérivant des patients et directement implantées chez la souris ont révélé une plus grande fiabilité pour prédire les réponses aux traitements systémiques. Ceci est probablement lié à la préservation des caractéristiques histopathologiques et moléculaires du cancer d'origine. Le recours aux animaux permet de reproduire un modèle oncologique proche de l'homme et de retrouver tout le microenvironnement tumoral permettant le développement des tumeurs et de se rapprocher au plus près des résultats qui pourront être observés par la suite en recherche clinique. L'utilisation des techniques de greffes de tissu tumoral permet donc une nouvelle modélisation pré-clinique indispensable à la découverte de médicaments plus efficaces et, à terme, curatif pour le RCC métastatique.

Ce projet utilisera 2750 souris sur 5 ans pour un nombre total de 50 patients. Les tumeurs rénales de ces souris seront imagées par imagerie par résonance magnétique (IRM) et nous permettront d'évaluer de façon non-invasive l'efficacité de nouveaux traitements par rapport aux thérapies existantes.

Dans ce projet les techniques utilisées sont parmi les plus raffinées et les moins invasives qu'il existe puisque les tumeurs seront suivies par IRM. Cette technique d'imagerie non-invasive permet de voir l'évolution tumorale sans avoir à faire mal à l'animal. De plus, leur bien-être sera au cœur de notre préoccupation par l'utilisation d'enrichissement, le maintien en groupe de cet animal grégaire ou encore le maintien optimal de ces conditions d'environnement.

7925 Nos précédents travaux ont permis de mettre en évidence l'effet bénéfique d'une association de 5 extraits de végétaux sur le métabolisme de souris diabétiques, à travers différents paramètres mesurés, tels que la glycémie, les tests de tolérance à l'insuline ou à l'amidon, le profil lipidique sérique ou la composition corporelle. Toutefois, les mécanismes physiologiques qui sous-tendent ces adaptations positives restent à élucider. Ce projet propose ainsi de combiner différentes conditions qui permettent l'activation de certains mécanismes qui nous permettront de mettre en lumière ceux qui sont impliqués.

La combinaison d'extraits de végétaux sera, de la même manière que nos précédents protocoles, incorporée dans la nourriture des animaux sur une durée de 2 semaines. Le projet inclus 4 groupes de 12 souris diabétiques et 4 groupes de 12 souris saines.

Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, test de tolérance à l'insuline, injection d'insuline, mesure de la glycémie à jeun ou en condition nourrie) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie par un technicien agréé et entraîné.

Le modèle de souris diabétique est particulièrement bien adapté à l'étude des syndromes du diabète, l'âge choisi correspond au début du développement du syndrome métabolique chez ce modèle. Le recours à un modèle *in vitro* n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement *in vivo*. Nous avons choisi de le compléter avec un modèle de souris saines afin de vérifier l'efficacité de la combinaison d'extraits de plantes sur un modèle non-mutant.

Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 12 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 48 souris db/db et 48 souris saines seront utilisées pour ces travaux de recherche.

7926 De nos jours, la vaccination est largement utilisée dans les élevages avicoles afin de protéger les animaux contre différentes maladies. Différents vaccins sont disponibles sur le marché. Les vaccins peuvent être administrés de différentes manières (spray, injection, eau de boisson, etc.) et il est primordial de s'assurer de la qualité de la vaccination. L'objectif est que les poulets soient protégés contre la maladie pour laquelle ils ont été vaccinés. Différentes méthodes peuvent être utilisées afin de vérifier la prise vaccinale, mais cela n'est pas toujours possible et dépend aussi du vaccin administré. L'analyse de sang est une des méthodes les plus utilisées à des fins diagnostiques et pour valider la bonne prise vaccinale. Cette technique ne prévoit pas la mise à mort des animaux et elle est largement utilisée sur le terrain. Le prélèvement sanguin n'est pas utilisable dans toutes les circonstances. D'autres techniques diagnostiques peuvent être utilisées afin d'évaluer la prise vaccinale. Des études scientifiques récentes montrent la possibilité d'utiliser les larmes afin de valider la prise vaccinale précoce chez les poulets et aussi pour évaluer l'immunité mucoale impossible à évaluer avec une prise de sang.

Objectif :

L'objectif primaire de ce projet est de valider l'utilisation des larmes afin d'évaluer précocement une prise vaccinale sur poulet sans avoir l'interférence des anticorps maternels et, ensuite l'objectif est d'adapter cette technique pour une utilisation à large échelle à niveau des élevages et des laboratoires de diagnostic.

Informations sur les espèces utilisées :

Ce projet sera réalisé avec un maximum de 3000 poulets conventionnels et 500 EOPS (Exempt d'Organismes Pathogènes Spécifiques) sur une période de 5 ans.

Mise en œuvre des 3R :

Remplacement : Pour ce projet, des pratiques terrain seront reproduites dans une structure expérimentale à petite échelle. L'utilisation de ce modèle vivant est essentielle pour pouvoir déterminer la bonne prise vaccinale.

Réduction : 86% des animaux utilisés dans le projet seront des animaux conventionnels vaccinés avec des vaccins commerciaux ayant déjà une AMM en France. 80% des animaux conventionnels ne seront pas euthanasiés à la fin des études, mais rentreront dans la filière alimentaire. En amont, lors des phases recherche, les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de poulets utilisés en limitant le risque d'études non conclusives.

Raffinement : Dans ce projet, il n'est pas attendu de douleur ou de souffrance chez le poulet. Une détermination de critères d'alarme non spécifiques les plus précoces possibles a été effectuée pour garantir une douleur minimale chez le poulet. Ces critères sont en constante évolution pour les améliorer afin qu'ils reflètent au mieux l'expérience.

Les animaux seront hébergés selon les normes en vigueur et dans le respect de leurs bien être.

7927 Les glioblastomes sont une des catégories les plus fréquentes de tumeur du cerveau et les moyens de les traiter sont encore peu développés. L'espérance de vie des patients ne dépasse pas 2 ans avec une mortalité globale de 75%. La compréhension du fonctionnement neuro-métabolique de ces tumeurs est indispensable pour mettre au point de nouveaux traitements. L'étude de ces tumeurs a révélé de profondes altérations métaboliques caractérisées notamment par une forte production d'acide lactique, ainsi qu'une surproduction de glutamate, principal acide aminé exciteur du cerveau. Cependant les concentrations des métabolites et neuromédiateurs présents à l'intérieur et autour des tumeurs n'ont jamais été précisément quantifiées. Ce type de mesure est néanmoins importante pour comprendre les effets cellulaires et moléculaires de ces modifications neuro-métaboliques. Notamment, il est connu que des concentrations trop élevées d'acide lactique peuvent entraîner une acidose du tissu péri-tumoral et contribuer à la mort des neurones présents autour de la tumeur. De plus, des concentrations excessives de glutamate et de son co-agoniste, la D-sérine, pourraient être responsables de l'apparition de crises d'épilepsie ou provoquer une mort cellulaire excitotoxique. L'étude du milieu interstitiel du cerveau nécessite l'utilisation d'animaux vivants car sa composition dépend des interactions entre la tumeur, le système vasculaire et le système immunitaire. Ces interactions ne peuvent pas être reproduites en culture cellulaire ou sur des explants de cerveau.

Le but de ce projet est de quantifier les concentrations de glucose, lactate, D-sérine et glutamate dans le fluide interstitiel intra- et péri-tumoral par un nouveau type de capteur optoélectrochimique qui couplera une mesure de fluorescence avec une mesure électrochimique des concentrations de ces molécules par des microélectrodes enzymatiques. Cette nouvelle technique sera implémentée sur un modèle de glioblastome murin où les cellules cancéreuses expriment un marqueur fluorescent. Ainsi, la mesure optique de la fluorescence permettra de déterminer la position exacte du capteur relativement à la frontière de la tumeur, et la mesure de concentration effectuée par électrochimie pourra être directement associée soit au tissu sain, soit à l'espace péri-tumoral, soit à l'espace intra tumoral. Ce projet se déroulera sur cinq ans avec un total de 65 souris. Les souris utilisées seront issues d'un élevage de souris génétiquement modifiées qui fournira des souris non porteuses de mutations et normalement destinées à être euthanasiées.

Ce projet se déroulera en collaboration avec une équipe universitaire possédant une expérience reconnue en neuro-oncologie et qui a déjà pratiqué ce modèle pendant de nombreuses années. Ce modèle ne provoque pas de morbidité et la croissance de la tumeur n'induit pas de souffrance

délectable par l'expérimentateur. Les animaux seront néanmoins observés quotidiennement et si des signes de souffrance apparaissent, la durée d'incubation de la tumeur sera réduite. Tout au long de ce projet, une vigilance particulière sera apportée à (1) la réduction du nombre d'animaux à un minimum permettant des analyses statistiques fiables, (2) au raffinement des méthodes d'expérimentation visant à réduire au maximum la souffrance animale, notamment par l'administration d'analgésiques pendant les 48h suivant la chirurgie et par un enrichissement du milieu de vie des animaux et un hébergement en groupes de 2 à 5 individus et (3) à remplacer dès que possible l'utilisation d'animaux vivants par des techniques moins invasives comme l'utilisation d'explants de cerveau post-mortem dès que leur mise en œuvre est jugée pertinente dans notre démarche expérimentale.

7928 Ce projet constitue la partie pratique d'un programme de Master (formation Bac + 5) destinée à former des chercheurs dans le domaine de la cancérologie. Au cours de cette formation, ils apprennent les techniques les plus récentes permettant le développement de traitements et de méthodes de diagnostic des cancers. Par la suite, ces étudiants s'intégreront dans des équipes de recherche du secteur public et de l'industrie pharmaceutique, en tant que responsables de projets. Les techniques qu'ils doivent connaître font appel à plusieurs disciplines scientifiques : la physiologie, l'endocrinologie, l'anatomo-pathologie, l'immunologie, l'imagerie médicale...

Les recherches en cancérologie peuvent ponctuellement faire appel à des modèles animaux. L'apprentissage des principes de base dans l'utilisation des animaux à des fins scientifiques est donc indispensable pour ces étudiants. Ils abordent ce sujet en découvrant les techniques *in vitro*, et les techniques *in vivo* qui peuvent être utilisées, en parallèle. La règle des 3R est le directeur de la formation. Dans une partie pratique, les étudiants apprennent l'abord et la manipulation des souris. Au cours de travaux pratiques, ils sont sensibilisés aux difficultés techniques et éthiques que représente l'utilisation des animaux. Même s'ils ne seront pas toujours amenés à manipuler eux-mêmes les animaux, ils devront prendre la responsabilité d'en utiliser dans des programmes de recherche. Il est donc important que tous les aspects, les contraintes, les avantages, les biais éventuels liés à l'utilisation d'animaux vivants leur soient présentés.

Dans notre projet, les étudiants manipuleront des souris saines pour s'initier aux techniques de base, sur des gestes peu invasifs. Chez d'autres souris, des tumeurs seront provoquées par injection de cellules cancéreuses, dans le but de montrer aux étudiants l'évolution des tumeurs et la nature des lésions. Dans ce cas, la vitesse de croissance des tumeurs étant très bien connue, les animaux seront suivis quotidiennement et ils seront euthanasiés selon une méthode non stressante avant que la tumeur ne provoque de souffrance.

Pour sensibiliser de futurs professionnels à l'éthique de l'expérimentation animale, le recours aux animaux vivants est limité au strict nécessaire, avec un nombre limité d'animaux par groupes d'étudiants et avec un nombre optimal d'encadrants compétents et formés. Il n'est pas possible de sensibiliser et former correctement des étudiants qui n'ont jamais manipulé de petits rongeurs sans les confronter à quelques spécimens vivants. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum, en fonction des effectifs des promotions de master. Au maximum, pour cette formation, il sera de 150 souris sur 5 ans, pour des promotions d'étudiants d'environ 60 par an.

7929 Avec le changement global, les poissons des zones côtières sont de plus en plus fréquemment exposés à une modification des paramètres de leur habitat : augmentation de température, eutrophisation ou encore diminution de la teneur en oxygène (hypoxie). Etudier dans quelle mesure ils sont capables de tolérer et de s'adapter à ces conditions, le plus souvent non létales mais néanmoins extrêmes, est donc primordial pour une meilleure prédiction des risques pour la conservation de ces espèces.

Afin de mieux comprendre les bases physiologiques de la tolérance à l'hypoxie chez le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), nous envisageons de comparer les capacités métaboliques d'animaux issus de deux groupes :

- un groupe de poissons présentant une forte tolérance à l'hypoxie (groupe T = tolérants)
- un groupe de poissons présentant une faible tolérance à l'hypoxie (groupe S = sensibles)

Afin de sélectionner les individus T et S, des animaux (n=85) seront soumis à un challenge hypoxique. Celui-ci s'apparente aux tests d'effort menés classiquement en médecine humaine ou en expérimentation animale sur le modèle mammifère. Durant ce challenge, les poissons seront exposés à une réduction progressive de l'oxygénation du milieu (durée totale de l'épreuve 6-8h) et lorsqu'ils perdront l'équilibre, ils seront immédiatement replacés en milieu normoxique pour leur permettre de récupérer. Ce point de déséquilibre, survenant à différents niveaux d'oxygénation selon les individus, permet d'estimer la sensibilité de chaque animal à l'hypoxie et de le qualifier de "tolérant" ou "sensible". Ce test d'effort est non létal et les animaux récupéreront pleinement leur état de santé et leur bien-être général en quelques jours.

Sur la base des résultats au challenge hypoxique, nous sélectionnerons 22 poissons T (les 22 derniers individus à perdre l'équilibre) et 22 poissons S (les 22 premiers individus à perdre l'équilibre). Nous souhaitons en effet étudier dans quelle mesure les bars T et S présentent des capacités métaboliques distinctes qui pourraient expliquer les différences de tolérance à l'hypoxie. Pour cela, nous envisageons de réaliser des expériences de spirométrie (3-4 semaines après le challenge hypoxique). Cette technique expérimentale n'est pas létale. L'expérience se déroulera en 3 temps :

- Au jour 1, les animaux seront nourris. De façon à contrôler et standardiser la prise alimentaire, une quantité d'aliment connue (4% de la masse corporelle) sera introduite dans l'estomac des animaux préalablement anesthésiés. L'aliment employé sera composé de chair de poisson (morceaux d'anchois sauvages d'environ 1 cm de diamètre et 0.5 cm d'épaisseur).

- Après une période de récupération de 3 heures, les animaux seront placés dans des spiromètres jusqu'au lendemain. Durant cette période, la consommation d'oxygène en phase postprandiale sera mesurée afin d'estimer le taux métabolique maximal des animaux. Les mesures seront effectuées en condition de normoxie (100% de saturation à l'air).

- Au jour 2, la consommation d'oxygène des animaux sera mesurée en condition d'hypoxie modérée : la teneur en oxygène dans l'eau sera progressivement réduite de 100% (saturation à l'air) à 40% (-0.5%/min environ).

A l'issue de l'expérience (durée de l'hypoxie : ~2 heures), les animaux seront replacés dans leur bac d'élevage.

Le projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

- le nombre d'animaux envisagé pour ce projet (n=85) est en conformité avec les exigences de Réduction. Il permet en effet de tenir compte des contraintes zootechniques et notamment de la densité minimale d'animaux requise pour satisfaire le comportement naturellement grégaire de l'espèce étudiée. Il permet aussi de s'assurer de la robustesse de nos analyses statistiques compte tenu de l'étendue de la variabilité interindividuelle des processus étudiés.

- nous répondrons également aux exigences de raffinement : tout sera mis en œuvre pour limiter au maximum l'angoisse et la souffrance des animaux expérimentés. Nous manipulerons les animaux avec soin et veillerons à ce qu'ils soient anesthésiés pour toute procédure ne requérant pas l'étude sur animal vigile.

- l'économie du modèle animal (Remplacer) ne pourra pas être faite dans la mesure où les processus étudiés s'appliquent à l'organisme vivant, dans son intégrité et toute sa complexité.

7930 Les formations concepteurs sont encadrées par l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Cet arrêté définit le programme de base et ce dernier doit comporter une partie : Procédure faiblement invasive : théorie et pratique.

L'objectif de cette formation est donc de sensibiliser les futurs concepteurs qui seront aussi amenés à manipuler de manière à être familiarisés avec le rongeur de laboratoire au travers des différents conseils et techniques de contentions, préhensions mais aussi de leur apprendre les bons gestes techniques.

En effet dans le cadre des 3R, le remplacement de l'animal n'est pas toujours possible et notamment lors de séances de TP réglementaires au sens propre de la loi. Toutefois nous utiliserons un nombre maximum d'une souris par apprenant et d'un rat pour 2 apprenants de manière à limiter le nombre

d'animaux utilisés Ces chiffres s'expliquent tout simplement par le fait que seuls les personnes qui utiliseront le rat feront les manipulations sauf les préhensions et contentions et par le fait qu'en 2014, les rats représentaient 7% des animaux utilisés en laboratoire de recherche contre 42% pour les souris. Les animaux utilisés durant des travaux pratiques le seront que pour un seul TP d'une durée de 4h. Le raffinement est respecté par le fait que 3 formateurs expérimentés seront présents à chaque séance de TP de manière à encadrer un petit groupe d'apprenant qui réalise tour à tour les manipulations sous l'œil exercé du formateur.

Avantage/ dommage. L'apprentissage de ces gestes bien exécutés vont dans le sens du bien-être animal et permettront de réduire la douleur lors de leur exécution. Seuls des procédures faiblement invasives seront réalisées sur rats et souris.

Ce projet de 5 ans compte 4 formations annuelles soit un total de 20 formations. Chaque formation aura besoin de 20 souris et 10 rats soit un total de 400 souris et 200 rats

7931 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité *in vivo* dans un voire des modèle(s) préclinique(s), c'est pourquoi nous voulons tester cette thérapie dans un modèle pertinent d'inflammation du côlon dont la pathologie est cliniquement proche de celle de l'homme chez la souris IL-10KO. Le nombre d'animaux utilisés sera de 120 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. De plus, les paramètres physiologiques seront contrôlés sous anesthésie et l'inconfort limité à l'aide d'analgésie entre autres si cela s'avère nécessaire.

7932 Chaque année plus de 2 millions de nouveaux cas de cancers de la peau sont déclarés dans le monde selon l'organisation mondiale de la santé. Bien que le mélanome ne représente qu'une faible partie des cancers cutanés, 232 130 nouveaux cas ont été rapportés de l'étude de 2012, situant ainsi le mélanome au 9ème rang des cancers. Les mélanomes se développent à partir de cellule de l'épiderme de la peau, les mélanocytes, cellules responsables de la pigmentation de la peau. Considéré comme le plus agressif des cancers de la peau, le mélanome est associé à une forte mortalité dans son stade le plus avancé. Le pronostic du mélanome dépend de l'état d'avancement de la maladie au moment du diagnostic. La présence de métastases ganglionnaires ou à distance est associée à un pronostic beaucoup plus sombre (entre 20 et 70% de survie en fonction du stade du mélanome) et ce malgré l'usage de la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et/ou de l'immunothérapie. L'utilisation de nouvelles thérapies tels que les nano vecteurs pourrait, de par leurs caractéristiques, améliorer la réponse thérapeutique d'agents chimio thérapeutiques déjà utilisés. La taille de ces objets, permettant d'échapper à la clairance rénale, ainsi que la possibilité d'effectuer des modifications de surface afin de les rendre «furtifs», l'organisme ne les reconnaissant pas comme étant des corps étrangers cela va augmenter considérablement le temps de circulation dans l'organisme de ces traitements et donc leurs effets. De plus la vascularisation tumorale hyperperméable, permet une accumulation de ces nanovecteurs au niveau tumoral.

Afin de prévenir une élimination rapide des nanoparticules, ces vecteurs sont couramment modifiés avec un polymère de polyéthylenglycol (PEG), afin de leur apporter des propriétés furtives. Cependant il a été montré que cette pegylation entraîne une réduction de l'internalisation cellulaire de ces objets. De plus, des études ont montré le caractère immunogène des nanoparticules pegylées, entraînant alors une élimination rapide des nano vecteurs après une seconde injection

Afin de conserver leur caractère furtif, il est préférable que ces nano vecteurs aient une charge en surface neutre ou négatives. Cependant des nanoparticules chargées positivement en surface montre une meilleure internalisation cellulaire, et donc une meilleure efficacité thérapeutique.

L'environnement tumoral connu pour être légèrement plus acide que des tissus sains, le but de ce projet est d'améliorer le ciblage tumoral de nanovecteurs par injection systémique de vecteurs « intelligents ». Le pH tumoral connu pour être légèrement plus acide que des tissus sains, entrainera une modification de la charge de surface de ces vecteurs, et donc une amélioration de leur internalisation au niveau tumoral.

Tout d'abord afin d'éviter le caractère immunogène du PEG les LNC sont modifiées avec de la polyvinylpyrrolidone (PVP), connu comme pouvant apporter des propriétés furtives. De plus afin de modifier leur charge de surface au niveau tumorale ; ces dernières seront modifiées avec des copolymères pH sensible de composé de PVP et de vinylimidazole (Vim), permettant d'améliorer l'internalisation des LNC au niveau tumoral.

Nous souhaitons ainsi, montrer l'intérêt de la modification de nano-objets par des polymères pH sensible de PVP-Vim qui permettent d'améliorer l'internalisation de nano vecteur et ainsi améliorer l'efficacité de thérapeutique pouvant être encapsulé dans ces objets.

Ce projet sera réalisé sur 130 rongeurs (souris)

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques à un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes 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=10 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.

7933 Durant ces dernières décennies, l'identification et la caractérisation de précurseurs ou de cellules souches issues de divers tissus adultes a donné un nouvel élan à la thérapie cellulaire dans le

domaine des pathologies musculaires. Plusieurs démonstrations précliniques de thérapie cellulaire allogénique ont été établies, révélant la pertinence de ce type de stratégie et sa meilleure efficacité comparée à la transplantation de cellules autologues corrigées. Cependant, l'injection locale de myoblastes allogéniques, qui correspondent au précurseur naturel des fibres musculaires, est associée à une efficacité limitée, notamment à cause d'un rejet immunitaire massif de ces cellules. D'autre part, les traitements immunosuppresseurs actuels, s'ils permettent d'améliorer la prise de greffe, conduisent également à des effets secondaires majeurs pour le patient. Au cours de nos précédents travaux, nous avons mis au point une stratégie d'induction de tolérance par transfert de gènes dans le foie. Nous avons montré qu'un protocole de thérapie génique consistant à exprimer spécifiquement dans le foie de souris receveuses, des allo antigènes de souris donneuses permet d'induire une tolérance immunologique à une greffe allogénique. Ces travaux 'preuve de concept' ont été réalisés dans un contexte de greffes d'îlots pancréatiques allogéniques. La problématique de ce projet est donc de savoir si l'induction de tolérance intra-hépatique pourrait aboutir à une meilleure prise de greffe des cellules souches musculaires allogéniques chez la souris. La réponse à cette question est nécessaire avant d'envisager l'application clinique de notre stratégie.

Pour répondre à cette question, un transfert de gène intra-hépatique sera réalisé chez deux modèles de souris dystrophiques ou non puis suivi d'une cryolésion musculaire et d'une injection intramusculaire (i.m) ou intraveineuse de cellules souches ou de précurseurs allogéniques. Les deux voies d'abord permettront de déterminer laquelle présente la meilleure efficacité. L'évaluation de prise de greffe de ces cellules ainsi que de la réponse cellulaire et humorale permettra d'estimer s'il y a eu induction de tolérance vis-à-vis de ces cellules. Le nombre d'animaux utilisé sera de 180 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux (optimisation des groupes contrôles et des temps d'euthanasie des animaux) avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher. Il est clairement décrit dans la littérature que les réponses immunitaires au sein du muscle font intervenir non seulement les cellules immunitaires mais également d'autres partenaires cellulaires et notamment des cellules endothéliales, des cellules satellites, et des fibroblastes. Ces interconnexions fines entre des partenaires différents, au sein d'un tissu lésé, c'est-à-dire dans un environnement très perturbé, rendent les expérimentations *in vivo* obligatoires, et limitent très fortement les possibilités de les remplacer par des études *in vitro* seules, la portée scientifique de celles-ci étant quelque peu restreinte.

7934 Les maladies génétiques liées à des déficits du métabolisme de certaines molécules (les donneurs de méthyle) sont causées par des mutations dans les gènes codant les protéines impliquées dans ce métabolisme. Parmi ces gènes, le gène de la méthionine synthase (Mtr) joue un rôle central et des mutations délétères entraînent une maladie appelée Homocystinurie-anémie mégaloblastique, groupe cblG. Cette maladie rare a une prévalence de 1 sur 1 million et présente des symptômes tels qu'une anémie mégaloblastique sévère ainsi que des troubles neurologiques variés (retard développemental, atrophie cérébrale, hypotonie, crises d'épilepsie, ataxie). Pour comprendre les mécanismes de cette pathologie et rechercher de nouvelles pistes thérapeutiques, nous avons développé un modèle de souris transgénique permettant l'inactivation conditionnelle du gène Mtr dans le cerveau. Cette lignée de souris nous sert de modèle pour la pathologie humaine. Nous l'utilisons pour tester de nouvelles pistes thérapeutiques, avec certains agents pharmacologiques.

1. Remplacement : il n'existe pas d'alternative d'approche *in vitro* car le projet porte sur l'étude du comportement de l'animal selon son statut génétique et en réponse au médicament.

2. Réduction : l'étude comportementale portera sur des groupes mâles + femelles de souris de laboratoire, réparties en 2 groupes d'études selon le génotype : contrôle (sauvage) ou invalidé pour le gène MTR (KO MTR). La cohorte de souris vieillissantes (1 an) sera subdivisée en deux sous-groupes : traités ou non traités avec l'agent pharmacologique. Cette cohorte de 80 souris sera étudiée et sacrifiée à l'âge d'un an. Une autre cohorte de souris âgées de 3 semaines sera étudiée, composée de 20 souris contrôles et 20 souris KO MTR (10 mâles et 10 femelles pour chaque génotype). Ainsi,

120 souris seront nécessaires pour cette étude afin d'obtenir une puissance statistique suffisante tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux.

3. Raffinement : toutes les procédures expérimentales (traitement pharmacologique, étude comportementale, sacrifice) auront lieu dans l'animalerie, dans un environnement sécurisant pour l'animal. Une procédure d'estimation et suppression de la douleur est mise en place. Le point limite est fixé selon un score défini au préalable et qui tient compte des signes éventuels de mal-être (isolement, yeux fermés, dos voûté, poils hérissés, immobilité, perte de poids, déshydratation, yeux et abdomen creux, automutilation). En fin de protocole, les animaux seront mis à mort et des organes prélevés pour permettre des analyses biochimiques.

7935 L'évolution du fonctionnement hospitalo-universitaire, tant du point de vue éthique qu'économique, et des techniques chirurgicales (en particulier en laparoscopie) ont conduit à déplacer l'apprentissage chirurgical hors du bloc opératoire, s'inspirant ainsi du modèle aéronautique : il s'agit de la simulation en santé.

La Haute Autorité de santé (HAS) en a fait une priorité nationale avec ses recommandations (qui s'imposent aux professionnels de santé) émises en 2012 : "jamais la première fois sur le patient"

Ce type d'apprentissage a démontré son intérêt pédagogique pour la gestuelle coelioscopique.

Là encore la HAS a préconisé le modèle animal pour l'apprentissage de la coelioscopie. Dans son "Guide de bonnes pratiques en matière de simulation en santé" publié en 2012 il est stipulé :

"L'expérimentation animale permet un apprentissage de gestes chirurgicaux simples (sutures) et complexes (coeliochirurgie chez le cochon par ex)."

Le but de ce protocole est double :

1-organiser des séances de formation initiale et continue en chirurgie laparoscopique sur modèle porcin, destinées aux chirurgiens junior et senior

2-évaluer l'impact direct de ces formations sur les habiletés techniques et jeter les bases de l'analyse de leur impact sur la qualité des soins en médecine humaine

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

- Le modèle animal est réservé aux procédures coelioscopiques (donc de haute technicité), les gestes chirurgicaux de base étant enseignés par simulation sur des modèles inanimés. Le modèle porcin vivant est à ce jour le seul permettant une formation technique des chirurgiens aux gestes complexes. L'absence de formations de ce type obérerait la qualité et la sécurité des soins en médecine humaine.

- Il s'agit de procédures sans réveil pour lesquelles une anesthésie profonde et une analgésie maximale sont utilisées.

La souffrance animale est donc réduite au maximum. Les animaux sont stabulés au maximum 5 jours en amont de ces procédures, dans un milieu enrichi comme exigé par la réglementation animale (balle, cordes, jouets spécifiques non dangereux notamment du risque d'inhalation et/ou d'ingestion.).

- Un seul sujet animal permet en une journée la formation de deux à six praticiens en permettant la réalisation de nombreux gestes chirurgicaux successifs.

Le nombre total d'animaux est de 20 par an sur cinq ans (soit au maximum 100)

7936 L'incidence croissante des maladies neurodégénératives impose d'explorer et de caractériser ce qui sous-tend leur initiation puis leur progression plus ou moins rapide.

Des démarches exploratoires-qui reposent sur le recours aux souris de laboratoire-ont permis de générer des informations biologiquement pertinentes, particulièrement quand les dommages de neurones cérébraux sont initiés dans des conditions reproductibles.

Nous voudrions comprendre par quels mécanismes la protéine prion est transférée entre les cellules du cerveau. Pour ce faire nous devons utiliser les modèles animaux. En effet, la propagation de la protéine prion dans des cultures cellulaires est différente et moins physiologique que dans les modèles animaux.

Nous injectons la protéine prion souche RML dans le cerveau des souris afin d'induire la maladie liée à la protéine prion. Nous travaillons également avec des souris qui n'expriment pas cette protéine prion pour comprendre les fonctions de cette dernière. Brièvement, après l'injection, dans le cerveau de souris de laboratoire, des protéines prions native ou mutées, (a) sont initiés et (b) progressent des dommages neuronaux subséquents à la formation non contrôlée d'agrégats incompatibles avec les fonctions physiologiques très complexes des neurones et leur vie.

Grâce, entre autres, à la disponibilité de souris dont les différents lignages du cerveau sont génétiquement marqués par des molécules fluorescentes reportrices, il est possible de coupler le recours à des souris génétiquement invalidées ou sur-exprimant la protéine prion native non mutée pour mieux identifier puis caractériser, soit *in vitro*, soit *in vivo*, les fonctions auxquelles contribue cette dernière.

Pour la conception expérimentale de ce projet, la règle des 3Rs (remplacer, réduire, raffiner) a été prise en compte. Nous mettons en œuvre pour chaque expérimentation : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, 2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations invasives qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une mise à mort, 4) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 5) une valorisation de chaque animal par des prélèvements effectués sur chaque animal. Pour le présent projet, 64 souris seront intégrées dans deux procédures de sévérité modérée, le point limite le plus tardif retenu étant l'apparition des premiers symptômes neurologiques.

Par ailleurs, nous développons et mettons au point des systèmes de cultures primaires qui nous permettront de réduire le nombre de souris de laboratoire à intégrer dans des groupes expérimentaux, les objectifs étant d'identifier et de caractériser les processus rendant compte du transfert, de l'agrégation et de la neuro-toxicité des protéines prions et d'autres protéines impliquées dans les maladies neurodégénératives.

7937 L'objectif de ce projet est de rechercher une éventuelle accumulation de gadolinium dans l'organisme suite à des administrations répétées de produits de contraste (chélates de gadolinium), lors d'examen IRM et l'éventuelle toxicité associée.

Plusieurs publications mettent en évidence chez l'homme des zones d'hyper signal dans des régions du cerveau visible par IRM suite à des injections multiples de produits de contraste gadolinés. De manière générale, la biodistribution à long terme des chélates de gadolinium dans l'ensemble de l'organisme est un sujet d'investigation continu.

Afin de répondre aux interrogations que soulèvent ces publications et aux questions posées par les autorités de santé, nous proposons un projet préclinique pour :

- Mettre en évidence chez l'animal des hyper signaux en IRM liés à l'accumulation de Gd
- Démontrer le lien entre les zones d'hyper signal observées en IRM et l'accumulation de gadolinium dans ces mêmes structures.
- Etudier si la rétention de Gadolinium est liée, ou non, à la structure des produits
- Etudier le mécanisme impliqué.
- Rechercher une éventuelle toxicité

Les espèces rat et souris ont été choisies car ce sont des espèces de référence pour toutes les études de toxicité exploratoire, qui permettent facilement une imagerie par résonance Magnétique.

Le nombre global de rongeurs sur les 5 années du projet est de 1300 (200 souris et 1100 rats), de façon à évaluer le risque de chacun des produits de contraste à base de gadolinium présents sur le marché, de décrire le mécanisme d'accumulation du gadolinium et la potentielle toxicité liée à sa présence.

Les procédures expérimentales mises en œuvre au cours de ce projet seront réalisées sous analgésie et anesthésie, gazeuse ou chimique (excepté pour certaines injections intraveineuses). Elles seront menées dans le respect des guidelines des instances connues ou bien ou des textes de références sur les volumes et les conditions d'injection. Les mêmes animaux serviront pour répondre à plusieurs

questions scientifiques (imagerie, comportement, dosages, études histologiques) afin de limiter le nombre total d'animaux.

7938 L'entéropathie environnementale pédiatrique (EEP), inflammation chronique de l'intestin grêle, est très répandue chez les enfants dans les pays en développement (jusqu'à 80% des enfants de <5 ans). Il semble y avoir un lien étroit entre ce syndrome et l'exposition constante à un environnement microbiologiquement contaminé. Il est cause de malnutrition et d'une efficacité réduite de certains vaccins dans les pays les plus pauvres. Même lorsque les malades sont transférés dans de meilleures conditions d'hygiène et soumis à un régime alimentaire adapté ce syndrome persiste pendant des mois et même des années. Les raisons de ce phénomène conduisant à une atteinte prolongée de l'intestin ne sont pas encore connues.

Bien que ce syndrome soit un des plus grands problèmes de santé publique, il n'a pas jusqu'à ce jour, bénéficié de recherches sur ses mécanismes pathogéniques. En l'état des connaissances actuelles, par conséquent, des thérapies ciblées et appropriées ne sont pas encore envisageables. Il n'existe en particulier pas de modèle qui permettrait d'étudier ce syndrome dans des conditions contrôlées de laboratoire.

- Nous proposons d'établir dans une première étape un modèle murin afin d'y caractériser la flore bactérienne, les métabolites ainsi que les changements immunologiques liés à ce syndrome.
- Dans le cadre d'un projet plus global qui étudiera les changements observés dans les selles de malades nous comparerons dans une deuxième étape les résultats de notre modèle avec les observations faites chez des malades atteints d'entéropathie environnementale.
- Une fois le modèle établi vérifié et caractérisé, nous étudierons dans une troisième étape les mécanismes de la guérison et les mécanismes moléculaires qui mènent à l'effet prolongé de ce syndrome.
- Dans un projet satellite, nous étudierons le rôle de la bactérie commensale Segmented Filamentous Bacterium, SFB dans la pathophysiologie de l'EEP en développant un modèle de monocolonisation de souris avec des SFB extraites de selles humaines.

Au maximum, 3576 souris seront utilisées sur 5 ans.

Le bénéfice attendu de ce projet est tout d'abord le développement d'un modèle murin qui ouvrira une approche analytique et expérimentale, seule capable de fournir les éléments de base d'une approche thérapeutique.

L'étude des mécanismes de persistance et de guérison permettra de mieux comprendre pourquoi ce syndrome est prolongé après le transfert des patients dans des conditions de meilleure hygiène et permettra d'établir et de tester des traitements et interventions ciblés sur des bases rationnelles afin de mieux prendre en charge ce syndrome chez les enfants atteints.

La contamination des souris avec des bactéries fécales pourrait avoir pour conséquence la survenue d'une légère inflammation intestinale accompagnée d'une éventuelle perte de poids. Des prises répétées de sang et de selles seront nécessaires pour suivre les signes d'inflammation. Le niveau de sévérité général maximum est modéré. Nous n'anticipons donc pas de souffrance majeure pour les animaux concernés.

Le recours à des souris est indispensable vu que l'étiologie du syndrome est vraisemblablement due à un déséquilibre dans la flore intestinale et du système immunitaire. La souris ayant un système immunitaire ainsi qu'une anatomie intestinale assez semblable à l'homme est donc le modèle de choix pour étudier ce syndrome.

Les souris resteront pendant toute la durée de l'expérience dans leur environnement habituel et ne seront jamais isolées afin de diminuer leur stress.

7939 Malgré les progrès faits ces dernières années, le cancer reste un problème majeur de santé publique et les patients sont toujours dans l'attente de traitements innovants efficaces. L'objectif de ce projet de recherche est de tester et de sélectionner chez l'animal, de nouvelles molécules anti-cancéreuses qui auront le plus de chances d'être efficaces chez l'homme. Afin d'atteindre cet objectif, nous

proposons de mettre en place des modèles de tumeurs greffées chez le rongeur. Ces tumeurs peuvent être d'origine humaine et, dans ce cas, être implantées sur des animaux spontanément immunodéficients, ou d'origine murine, implantées sur des animaux sains, permettant ainsi de maintenir un environnement immunitaire normal. Les tumeurs seront implantées sous anesthésie soit sous la peau des animaux, soit dans la glande mammaire pour les tumeurs du sein, permettant de reproduire le microenvironnement tissulaire d'origine et ainsi être plus proche de la pathologie humaine. Les nouveaux candidats médicaments seront ensuite administrés à l'animal et leurs effets seront évalués par une mesure régulière de la taille de la tumeur. Cette mesure est non invasive compte-tenu de l'accessibilité et de l'emplacement superficiel de la tumeur

L'administration de ces composés pourra se faire par différentes voies choisies en fonction de l'objectif de l'étude, de la molécule à tester, de sa durée de vie dans la circulation sanguine et de l'indication thérapeutique. Des prélèvements de sang seront réalisés à différents temps après leur administration ou tout au long de l'étude afin de mesurer leur concentration plasmatique au cours du temps ou d'évaluer l'apparition d'un biomarqueur indicateur d'efficacité anti tumorale.

Les candidats médicaments testés sur ces modèles auront au préalable démontré une efficacité dans des tests cellulaires et auront également montré une présence dans l'organisme suffisante, afin de ne tester que ceux ayant un potentiel d'activité.

Dans l'objectif de raffinement, des points limites stricts sont appliqués, notamment sur la taille de la tumeur et sur son aspect, ainsi que sur l'effet du traitement sur l'état général des animaux. D'autre part, toutes les procédures techniques sur les animaux seront réalisées selon les standards validés par le comité d'éthique (fréquence de prélèvements de sang, les méthodes d'administration des composés, ...). Pour chaque lignée tumorale utilisée, les experts (dont la structure du bien-être animal) analyseront les conséquences des procédures sur le bien-être des animaux, la validité des résultats scientifiques obtenus, et ils détermineront les points limites ainsi que la stratégie du suivi clinique. Les animaux seront suivis individuellement et ils seront obligatoirement mis à mort lors de l'atteinte des points limites définis dans chaque procédure.

Afin de limiter le nombre d'animaux utilisés, pour chaque type de tumeur implantée, une analyse statistique sera réalisée afin de déterminer le nombre d'animaux nécessaire à l'obtention d'un résultat permettant de conclure à l'efficacité du produit.

Cette étape d'évaluation d'activité sur modèles animaux est indispensable et ne peut être remplacée pour garantir la sécurité et l'efficacité des candidats médicaments qui seront ensuite testés chez l'homme.

Durant les cinq années de ce projet, nous allons utiliser 12000 animaux soit 10000 souris et 2000 rats en raison du nombre de candidats médicament à tester.

7940 La fibrillation auriculaire (FA) est le plus commun des troubles du rythme cardiaque, affectant 1 à 2% de la population. En Europe, plus de 6 millions de personnes souffrent de cette arythmie, et sa prévalence devrait croître d'au moins 2.5 fois dans les 50 prochaines années avec le vieillissement de la population. La FA augmente le risque d'accident cérébral de 5 fois, le risque d'insuffisance cardiaque de 3 fois, de 2 à 3 fois la probabilité d'une hospitalisation et de 2 fois le taux de mortalité. La fibrillation auriculaire est principalement déclenchée par des foyers ectopiques de la veine pulmonaire (VP). Cette découverte historique a mené au développement d'un traitement curatif basé sur l'exclusion de ces sources veineuses par thérapie cryo ou thermo ablativ. Ce traitement fait maintenant partie des recommandations internationales dans la prise en charge de la FA. Cependant, chez les patients présentant une FA persistante, la maladie affecte largement le tissu atrial avec une variabilité de l'étendue et de la localisation du substrat arythmogène lié à la fibrose et au remodelage électrophysiologique. Le succès thérapeutique par l'ablation est donc plus faible, due à la difficulté de localiser le substrat chez ces patients.

Le but principal de ce projet est d'étudier la fibrose et le remodelage électrophysiologique des oreillettes afin de mieux comprendre et de mieux traiter la FA persistante. Spécifiquement, nous souhaitons valider une nouvelle approche d'imagerie de la fibrose et du substrat arythmogène au niveau atrial par IRM. Bien qu'il ait déjà été démontré que L'IRM permet de voir la fibrose ventriculaire (par confrontation à l'histologie), aucune étude à ce jour n'a montré cela au niveau des oreillettes. De

plus il est probable que la fibrose atriale soit associée à des bouleversements de l'activité électrique mais cela n'a pas été étudié systématiquement. Nous avons des séquences IRM particulières nous permettant de faire l'imagerie de rehaussement tardif atrial. Nous souhaitons démontrer que le rehaussement tardif atrial correspond à de la fibrose en histologie et que ces zones de fibrose ont un rôle dans la perpétuation de la FA ce qui ouvrirait la voie à de nouvelles perspectives thérapeutiques.

Le modèle pathologique utilisé dans ce projet consiste en l'implantation (sous anesthésie générale) d'un stimulateur cardiaque afin d'obtenir une FA persistante chez la brebis. En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires, le REMPLACEMENT des animaux n'est actuellement pas possible à ce jour.

Suite à cette période les animaux seront prémédiqués, maintenus sous anesthésie générale, leur cœur sera imagé avec une IRM clinique 1.5 T puis les artères et les veines fémorales seront cathétérisées pour permettre d'accéder au cœur et d'étudier les propriétés électrophysiologiques. Suite aux mesures *in vivo*, les animaux toujours sous anesthésie générale seront euthanasiés et le cœur explanté pour effectuer des expériences *ex vivo* et *in vitro*. Les résultats de ces études seront comparés à ceux obtenus sur un groupe contrôle (sham) dans lequel les stimulateurs ne seront pas activés.

Afin de REDUIRE le nombre d'animaux utilisés dans ce projet et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 60 moutons au total pour une période de 3 ans. Il s'agit du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité exploitable et permettant une analyse statistique fiable. Les retombées scientifiques principales de ce projet seront (i) la caractérisation de la fibrose atriale par IRM et (ii) la caractérisation du remodelage électrophysiologique dans la FA persistante.

Le RAFFINEMENT du projet et le respect du bien-être animal reposent sur plusieurs mesures :

- les animaux sont hébergés dans des locaux agréés et bénéficient de soins quotidiens dispensés par du personnel compétent et soucieux du bien-être animal
- les animaux sont habitués au personnel animalier afin de limiter tout stress
- une surveillance vétérinaire quotidienne est assurée
- les animaux sont hébergés en groupes sociaux ce qui leur permet d'exprimer des comportements naturels
- ils disposent d'enrichissements adaptés (foin et pierre à sel)
- toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale (mise en œuvre et surveillée par du personnel dédié) et une analgésie adaptée est systématiquement mise en place
- des critères d'alerte précis sont surveillés; si l'animal présente un signe d'appel, des mesures adaptées sont mises en place immédiatement (ajout d'analgésique par exemple).

7941 L'évolution des systèmes d'élevage avicoles vers une limitation des intrants (notamment alimentaires) implique la recherche d'animaux résilients face à des conditions changeantes et parfois peu favorables. Ceci passe par une meilleure prise en compte dans les schémas de sélection avicoles de l'équilibre entre production et capacités d'adaptation des animaux, au travers de critères tels que l'efficacité digestive. Après avoir mis en évidence que l'efficacité digestive dépendait fortement de la génétique des animaux, deux lignées de poulets (bons et mauvais digesteurs D+ et D-) ont été sélectionnées sur leur capacité à digérer le blé. Les différences d'efficacité digestive sont accompagnées de modifications de la morphologie, de l'histologie et de la fonctionnalité du tube digestif. Lors d'un précédent projet, nous avons pu mettre en évidence des différences d'expression de gènes entre 4 tissus du tractus digestif d'animaux. En revanche, la variabilité de l'expression des gènes entre ces animaux bons et mauvais digesteurs semble indiquer qu'il existe différentes façons d'être efficace/peu efficace. Cela pourrait être en partie dû à une différence de cinétique dans la mise en place des fonctions digestives. En effet, si aucune différence n'est observée à l'éclosion, D+ et D- se distinguent nettement à 7 jours, tant pour le développement du tractus digestif que pour l'efficacité digestive. L'objectif principal du projet est d'identifier les gènes clés impliqués dans la cinétique de mise en place des fonctions digestives et donc dans le contrôle de l'efficacité digestive. Ce projet

permettra donc en premier lieu d'améliorer la connaissance des réseaux de gènes impliqués dans cette fonction chez le poulet de chair. D'autre part, ce travail contribuera à l'identification de marqueurs pertinents de la fonction digestive, utilisables en sélection, afin de proposer de nouvelles stratégies de sélection adaptées aux enjeux de demain (maîtrise des intrants et des rejets en aviculture, notamment).

Afin de répondre aux objectifs, une étude de l'expression des gènes du tractus digestif sera réalisée sur 120 animaux des lignées pures D+/D-, nourris avec un régime difficile à digérer. A 5 stades de développement du système digestif (7, 14, 24, 35 et 50 jours), 12 animaux par lignée seront euthanasiés pour prélèvement de tissus et prise de sang. Ces 5 temps correspondent à des temps clés du développement du tractus digestif et à l'adaptation du tractus digestif à l'aliment. Compte-tenu des résultats obtenus précédemment sur ces lignées, les segments à étudier en priorité sont le gésier et l'intestin pour leur rôle dans le broyage et l'absorption des aliments.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour sélectionner sur l'efficacité digestive, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et le placement en cage individuelle est limité à la durée de la mesure de l'efficacité digestive. De plus, le milieu d'élevage est enrichi.

7942 Le cerveau est un organe extraordinairement complexe qui se développe au début de la vie embryonnaire. Le développement du cerveau résulte de l'exécution de programmes génétiques et cellulaires finement régulés et est fortement influencé par des facteurs environnementaux. Des mutations génétiques ou des agressions de l'environnement telles que l'infection maternelle, provoque des modifications de ces programmes et peut conduire à des maladies mentales et notamment l'autisme ou la schizophrénie.

Les troubles du spectre autistique affectent 1% des jeunes enfants. Un enjeu majeur est de comprendre les mécanismes impliqués dans leur développement, pour à terme parvenir à les contrecarrer. Disséquer les modifications chimiques et fonctionnelles du système nerveux central et trouver de nouvelles cibles pour le développement futur de thérapies implique le recours à l'expérimentation animale. Dans ce projet nous mettrons en place des tests de comportement chez le jeune souriceau (Procédure n°1). Ces tests seront utilisés pour optimiser un modèle murin d'autisme obtenu par l'activation du système immunitaire pendant la gestation (Procédure n°2). Enfin deux approches thérapeutique ciblant indépendamment deux molécules du système immunitaire dérégulées dans ce modèle seront tentées et leur efficacité sera testée chez le jeune (Procédure n°3) et chez l'adulte (Procédure n°4).

Nous appliquerons la règle des 3 R :

Remplacer : En parallèle des expérimentations sur l'animal, nous effectuons des expériences *in vitro* dans des lignées cellulaires pour tester l'effet des molécules du système immunitaire identifiées chez l'animal et valider l'approche thérapeutique les ciblant dans les Procédures n°3 et n°4.

Raffiner : Nos conditions d'élevage impliquent : stabulation par 4-6 animaux, enrichissement du milieu, température et hygrométrie contrôlée et suivi quotidien des animaux. La majorité des procédures pourront générer un inconfort faible et de courte durée, mais non dommageable pour l'animal. Pour les procédures compromettant le bien-être de l'animal, un suivi sous forme de grille de score (fournie en annexe) permettra de détecter une souffrance potentielle et de décider du devenir de l'animal au cours de l'expérimentation, notamment par la mise en œuvre de point limites précoces et adaptés.

Réduire : Nous utiliserons des tailles d'échantillon garantissant une puissance statistique suffisante pour l'analyse des résultats de comportement. Ainsi, des calculs de puissance réalisés avec un logiciel dédié ont permis de déterminer au plus juste les effectifs de groupe à utiliser pour observer des effets de petite taille avec les tests statistiques adéquats.

Un total de 1840 animaux est requis pour ce projet.

7943 Le développement d'une tumeur fait intervenir de nombreux moyens de communication entre les cellules tumorales ainsi qu'entre les cellules tumorales et les cellules saines à proximité ou non du site tumoral. Un de ces moyens de communication se fait à travers la libération de petits fragments de cellules que l'on nomme vésicules extracellulaires. Ces vésicules contiennent différents types de molécules dont des protéines et des facteurs de croissance qui sont ainsi transférés d'une cellule à une autre et permettent de changer le comportement de la cellule receveuse. Dans une tumeur, cela a des effets sur la croissance tumorale, sur les vaisseaux sanguins tumoraux, sur la réponse immunitaire mais aussi sur la dispersion des cellules cancéreuses vers d'autres organes.

Lorsqu'une tumeur est traitée par un traitement anticancéreux, il arrive que l'efficacité du traitement diminue car la tumeur devient résistante. En effet, il a été montré que certains traitements anticancéreux augmentent la libération de vésicules extracellulaires par les cellules tumorales et que les messagers transportés par ces dernières soient davantage impliqués dans la progression tumorale et contribuent donc à la résistance au traitement. Parmi ces traitements, nous avons choisi de travailler avec deux thérapies dont les vésicules extracellulaires libérées *in vitro* ont un impact sur la formation des vaisseaux sanguins tumoraux : la thérapie photodynamique qui cible les cellules tumorales et le bevacizumab (Avastin) qui cible les vaisseaux sanguins.

Nous avons récemment développé un algorithme mathématique de traitement d'images permettant l'analyse de la structure des vaisseaux sanguins de tumeurs pouvant être observés chez la souris, au cours du temps, par microscopie.

Notre projet consiste, en appliquant cette méthodologie, à évaluer, *in vivo*, l'impact de la libération des vésicules extracellulaires sur les vaisseaux sanguins sains et tumoraux.

A terme notre objectif est de disposer d'une méthode de sélection préclinique des médicaments anticancéreux permettant l'identification et le choix de celui ou de ceux ayant le moins d'impact sur la libération des vésicules extracellulaires d'une part et sur la résistance aux traitements induite par ces derniers d'autre part.

Les expérimentations seront réalisées sur des souris adultes athymique nude de 6 à 12 semaines. La réalisation de ce projet nécessitera au maximum l'utilisation de 109 souris. Le plan d'expérimentation prévu a été conçu de façon à pouvoir réduire le nombre d'animaux utilisés selon le déroulement des expérimentations et les résultats observés (Réduction). Cinq procédures expérimentales seront effectuées. Parmi celles-ci, une procédure expérimentale présente un degré de sévérité modéré et quatre procédures expérimentales présentent un degré de sévérité léger.

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), et mises à mort dès lors que l'un des points limites sera atteint (Raffinement). Pour cette étude, il n'est pas possible de Remplacer totalement l'utilisation des animaux mais l'utilisation de techniques d'imagerie non invasive visant à suivre la vascularisation au cours du temps sur une même souris permet de Réduire le nombre total d'animaux utilisés.

7944 Le cancer du sein est le cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France, comme dans l'Union européenne et aux États-Unis. Cette maladie reste la première cause de décès par cancer chez les femmes en 2012 en particulier dû au développement métastatique (os, le foie, les poumons et le cerveau).

Le cancer du sein métastatique peut être traité avec de la radiothérapie, de la chimiothérapie et de l'hormonothérapie. Ces traitements apportent rarement une guérison, mais ils peuvent retarder la progression du cancer, diminuer les symptômes reliés au cancer, améliorer la qualité de vie et la prolonger.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche *in vitro*, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées et des approches *in vivo*, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez

lesquels des tumeurs cancéreuses sont transplantées. Les modèles *in vitro* ne recréent ni la diversité de l'environnement des tumeurs, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles molécules anti tumorales.

L'objectif de cette étude est de mettre en place des modèles de cancer du sein chez la souris et le rat, pour permettre l'évaluation de nouvelles molécules anticancéreuses. Il est nécessaire de développer ces modèles dans 2 espèces pour s'adapter au mieux aux candidats médicament testés (pharmacocinétique, expression de la cible...). 2 modèles seront développés :

- Modèle sous cutanée qui n'induit pas de développement métastatique donc moins représentatif de la physiopathologie humaine mais qui est une approche moins sévère.
- Modèle orthotopique (glandes mammaires) qui consiste en une implantation tumorale au niveau de son site anatomique d'origine. Ce modèle permet à la tumeur d'acquérir un comportement invasif plus proche de la réalité clinique et de générer des métastases à distance (ganglions lymphatiques, poumon...). Ce modèle, plus sévère, est néanmoins plus proche de la physiopathologie cancéreuse et donc est plus prédictif.

Le nombre de souris et de rat nécessaire à cette étude est de 1290 et 520, respectivement en raison de 10 animaux par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs), le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

La croissance tumorale et le développement de métastases seront suivis au cours du temps (jusqu'à 8 semaines) par des techniques non-invasives : mesure par imagerie de fluorescence et de luminescence. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

7945 La recherche translationnelle dans les syndromes de vieillissement prématuré causés par des mutations dans le gène LMNA ou les gènes associés fait l'objet de nos travaux de recherche.

A ce jour, 12 syndromes, appelés « laminopathies », ont été associés à des mutations du gène LMNA, qui code pour les lamines de type A et C. Il a été rapporté en 2003 qu'une mutation hétérozygote dans ce gène (p. G608G au niveau protéique) est à l'origine du syndrome de vieillissement prématuré dit « Progeria typique » ou Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome (HGPS). Il s'agit d'une pathologie extrêmement sévère et rare de l'enfant qui se caractérise par un retard de croissance, une ostéolyse, une lipodystrophie et une athérosclérose sévère et disséminée. Différents mécanismes physiopathologiques interviennent, causés par l'accumulation nucléaire d'une protéine anormale dérivée de la Lamine A, la « progérine ». Celle-ci induit de nombreux dysfonctionnements dans les processus nucléaires fondamentaux, conduisant à une mort et une senescence cellulaire accélérées. Les patients décèdent à l'âge moyen de 13 ans, suite à un infarctus du myocarde dans la plupart des cas.

Notre objectif est d'utiliser la souris comme modèle afin d'obtenir des preuves précliniques d'efficacité thérapeutique *in vivo*, après une première étape *in vitro* montrant l'efficacité de l'approche utilisée. Nous avons donc créé et caractérisé un modèle murin Knock-in LmnaG609G/G609G qui reproduit la pathologie observée chez l'homme, tant du point de vue phénotypique que moléculaire. En effet, les souris HGPS LmnaG609G/G609G produisent la progérine par le même mécanisme d'épissage anormal observé chez l'homme.

Notre objectif est donc de tester différentes approches thérapeutiques (molécules pharmacologiques, thérapie génique, restriction calorique ...) et voies d'administration dans le cadre d'essais précliniques sur l'animal, dans le but de créer des preuves de principe précliniques permettant de passer à une phase d'essai clinique chez les patients.

Dans le cadre de la recherche de nouvelles approches thérapeutiques, nos études étant basées sur l'analyse des paramètres cliniques associés à la progéria (courbe de croissance, durée de vie, poids, structure histologique de la paroi aortique...), nous ne pouvons pas nous passer de l'utilisation d'un modèle animal. Aussi, nous intégrerons à l'ensemble de nos protocoles une démarche éthique et respecterons la règle des 3R.

Les souris utilisées seront hébergées dans un établissement utilisateur agréé et manipulées par du personnel compétent.

Durant la durée du projet, afin de respecter leur instinct grégaire, et dans la mesure du possible, les souris en cours de traitement seront stabulées dans des cages par petits groupes de trois à six animaux. Si le protocole exige l'isolement de l'individu, celui-ci sera mis exceptionnellement dans une cage individuelle. L'environnement de toutes les souris sera enrichi à l'aide de maisonnettes en carton.

Dans le cas d'essais impliquant des molécules pharmacologiques, la voie intrapéritonéale sera tout d'abord utilisée. Si l'efficacité de la molécule pharmacologique est démontrée par les analyses statistiques, la voie d'administration orale (nourriture ou eau de boisson) sera testée en prévision d'un transfert non invasif chez l'Homme. Si la voie (IP) ne montre pas d'efficacité, la voie d'administration intraveineuse (IV) sera utilisée en deuxième recours. Si celle-ci ne se révèle pas efficace (IV), l'étude sera arrêtée, tandis que dans le cas contraire (efficacité en IV), la voie orale sera testée.

La voie IV sera aussi utilisée comme voie exclusive dans le cadre d'une thérapie génique avec des vecteurs AAV.

Des aiguilles de type 27G ½ po seront utilisées afin d'occasionner le moins de douleur possible à l'animal. Le volume maximal injecté est 0.2 ml par voie intrapéritonéale et 0.1 ml par voie intraveineuse.

Les statistiques nous permettront de déterminer l'efficacité d'un traitement et de définir le nombre d'animaux à utiliser (le nombre limite de 18 par lot ne sera pas dépassé). L'efficacité du traitement sera évaluée grâce à différentes approches qui nous permettront d'évaluer la durée de vie, le poids et le bien-être de l'animal (phénorak), son état physique (grip), l'évolution de marqueurs/paramètres moléculaires (histologie, RT-PCR, western blot).

Le nombre total de souris qui seront soumises à des tests expérimentaux sera au plus de 1014. Tout sera mis en œuvre pour limiter la souffrance et la douleur des animaux. Aussi, lors de nos études, les souris seront suivies quotidiennement pour détecter tout signe d'inconfort. Les traitements envisagés devront montrer une absence de toxicité se traduisant par des altérations de la consommation alimentaire, hydrique, du comportement, de la respiration et des excréments ; une perte de poids de plus de 20% par rapport à la moyenne du groupe témoin, ou des lésions anatomo-pathologiques (examen macroscopique puis analyse histologique de coupes de tissus si nécessaire). Un animal ayant un tel profil clinique sera considéré en souffrance et immédiatement euthanasié, donc éliminé de l'étude.

7946 La fibrose hépatique est la conséquence de toutes les maladies chroniques du foie et ce, quelle qu'en soit la cause (virus, médicaments, alcool, obésité...). La cirrhose représente un stade évolué de la fibrose et s'accompagne d'une perte progressive des fonctions hépatiques et peut évoluer dans un certain nombre de cas, vers le cancer hépatique. La fibrose se caractérise par la présence d'un tissu cicatriciel dans le foie. Les cellules hépatiques stellaires sont les principales cellules du foie impliquées dans le processus de fibrose. Dans un foie sain, ces cellules sont quiescentes. Lors d'une maladie hépatique, les cellules hépatiques stellaires s'activent, sécrètent de la matrice extracellulaire en excès, ce qui génère la fibrose.

Nous avons identifié un facteur de transcription PRDM16 dont l'expression est induite spécifiquement au cours de l'activation des cellules hépatiques stellaires. Notre hypothèse est que PRDM16 pourrait jouer un rôle dans la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire par les cellules hépatiques stellaires. Nos résultats préliminaires montrent que l'inactivation de PRDM16 dans une lignée de cellules hépatiques stellaires entraîne une diminution de la synthèse des constituants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène. Afin de valider ces résultats *in vivo*, nous souhaitons invalider PRDM16 spécifiquement dans les cellules hépatiques stellaires en croisant des souris PRDM16

floxées avec des souris LRAT-CRE (exprimant la Cre-recombinase sous le contrôle du promoteur LRAT et qui serviront aussi de contrôles) et étudier la conséquence de cette invalidation dans des modèles de fibrose.

Les procédures expérimentales ne peuvent pas être remplacées par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants. En effet, dans le but de déterminer le rôle de PRDM16 dans la régulation de voies de signalisation de la fibrose au sein du tissu hépatique, l'utilisation des modèles de rongeurs est nécessaire.

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Un animal servira pour plusieurs expériences (exemple : traitement pro-fibrotique, sacrifice, examen d'histologie et de biologie moléculaire sur les tissus d'intérêt). 240 souris et 200 rats seront nécessaires à la réalisation de nos objectifs. Le modèle murin est utilisé dans ce projet car les modèles génétiques ont été validés chez la souris. La souche C57Bl/6 a été privilégiée car sa physiologie est connue et il est bien décrit qu'un régime obésogène et/ou diabétogène est capable d'induire une insulino-résistance en quelques semaines chez cette souche. Le rat est préféré à la souris concernant la mise en culture de cellules hépatiques primaires (hépatocytes et cellules hépatiques stellaires) car il permet d'obtenir un plus grand nombre de cellules et, par conséquent, de limiter le nombre d'animaux utilisés.

Enfin, l'aspect et le comportement des animaux seront évalués lors du change par les personnels de l'animalerie et un suivi de poids des animaux sera effectué de façon bi-hebdomadaire par les expérimentateurs en charge de l'étude. Ce suivi rapproché permettra une détection précoce de toute souffrance subie par les animaux et, le cas échéant, entraînera l'euthanasie immédiate.

7947 Les mastocytes sont des cellules du système immunitaire. Localisées dans tous les tissus à l'interface entre le corps et l'environnement extérieur, les mastocytes jouent un rôle de sentinelle dans la défense du corps humain face aux pathogènes et agressions extérieures. En effet, en tant que cellule en première ligne de défense du corps humains, les mastocytes sont capables de déclencher des réponses inflammatoires. Le besoin de greffes en médecine va en s'accroissant et nécessitent de mieux comprendre pourquoi notre corps rejette ou accepte une greffe. Notre question posée est donc d'étudier le rôle des mastocytes dans la tolérance ou le rejet de greffe. Nous utiliserons comme modèle de greffe, la peau car celle-ci est 1/ facile à greffer, 2/ l'observation de la tolérance ou du rejet est directe. Pour réaliser ce projet nous utiliserons 366 animaux (souris *Mus musculus* RMB de fond génétique C57Bl/6) répartis de la façon suivante : 1) étude de la présence ou absence de mastocyte pour établir la courbe de tolérance/rejet de greffe (60 animaux); 2) étude des populations du système immunitaire à différents temps (Jour 2 et jour 6 correspondant à l'initiation du rejet et au pic de la réaction immunitaire de rejet) afin de comprendre le rôle des mastocytes sur l'activation des autres cellules du système immunitaires (recrutement et migration vers les ganglions (120 animaux); 3) expression des cytokine et chimiokine par le tissu et les ganglions drainants l'oreille pour comprendre le mécanisme biologique d'activation du système immunitaire (120 souris); 4) visualisation de la dynamique des lymphocytes T régulateurs et des cellules dendritiques dermales langerine+ (recrutement, mobilité et interaction avec les mastocytes) par microscopie intravital non invasive (16 souris); 5) Preuve de concept par déplétion des lymphocytes T régulateurs ou des neutrophiles ou blocage par injection de drogue de l'activation des mastocytes sur le rôle des mastocytes dans l'initiation du rejet de greffe (50 animaux). Ce projet permettra de mieux comprendre et aider à contrer les rejets de greffe. Ce projet est conforme aux règles des 3R en limitant le nombre d'animaux au minimum requis pour la validité statistique tout en gardant les contrôles adéquates permettant d'apporter les conclusions scientifiques irréfutables (nombre de souris sur les modèles des publications). Raffiner : Les signes extérieurs de souffrance chez la souris (état prostré, aux poils hérissés, yeux fermés) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Remplacer : compte-tenu de l'étude *in vivo* du rejet de greffe et de la complexité de la réponse immunitaire globale dans son ensemble ainsi que la structure de l'oreille interne, il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres modèles. Les études mécanistiques propres de l'action des mastocytes sur une cellule cible seront par contre validées *in vitro* à l'aide de modèle de culture cellulaire.

7948 Ce projet a comme but principal d'étudier les conséquences comportementales de l'exposition au cannabis pendant l'adolescence. En effet, il est estimé qu'en France il y a 350000 utilisateurs quotidiens et que cette consommation est largement répandue parmi les jeunes adultes. Ainsi, il y a un fort risque que cette consommation induise des conséquences qui persistent à l'âge adulte malgré l'éventuel arrêt de l'usage.

Dans ce projet, nous voulons étudier si une exposition chronique à de faibles doses de tétrahydrocannabinol (THC), principe actif du cannabis, ou des agonistes synthétiques des récepteurs cannabinoïdes, produit des altérations comportementales à l'âge adulte.

Nous allons étudier des comportements très variés tels que la sensibilité à des récompenses naturelles (sucre et activité physique), les comportements cognitifs (flexibilité comportementale et impulsivité), l'anxiété et la sensibilité à la douleur.

Ces expériences se déroulent en 3 phases différentes.

La phase 1 correspond à l'exposition au agonistes cannabinoïdes pendant l'adolescence du jour 42 au jour 63 après la naissance.

La phase 2 correspond à un screening de comportement tel que l'anxiété et la sensibilité à la douleur à l'âge adulte.

La phase 3 correspond aux tests de mesures de sensibilité à la récompense naturelle ou de cognition à l'âge adulte.

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 seront hébergés avec du matériel d'enrichissement (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 672 rats seront nécessaires pour obtenir des données qui soient analysables statistiquement. Un suivi quotidien des animaux sera effectué.

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.

7949 L'absence d'une protéine de la matrice extracellulaire, la substance entourant les cellules des tissus, est responsable d'un groupe hétérogène de maladies neuromusculaires. Nous avons reproduit dans la souris une mutation identifiée chez un patient présentant cette forme de myopathie. Les animaux homozygotes sont viables, fertiles, et ont une durée de vie normale. Ils développent une faiblesse progressive des muscles squelettiques. Dans ce modèle, comme chez l'homme, la fonction cardiaque n'est pas altérée alors que la protéine étudiée est exprimée dans ce tissu, tout comme dans le muscle squelettique.

L'objectif de ce projet est d'utiliser des approches complémentaires permettant de mieux comprendre comment le muscle cardiaque réussit à s'adapter à l'absence de la protéine étudiée, contrairement au muscle squelettique. Nous allons donc étudier la fonction cardiaque au long de la vie des animaux (étude longitudinale) et dans un contexte de stress mécanique sur le cœur (augmentation du rythme cardiaque) à différents âges. Le projet nécessitera l'utilisation de 60 animaux (contrôles et homozygotes de mêmes portées). L'étude longitudinale par des techniques non invasives permettra de réduire le nombre d'animaux puisque les mêmes animaux seront étudiés à différents âges, et elle ne sera réalisée que chez des mâles. Les animaux contrôles sont issus des mêmes portées que les homozygotes. Le cœur étant un tissu complexe avec de nombreux types de cellules différentes interagissant (cellules cardiaques, vaisseaux sanguins, cellules du tissu interstitiel), il n'y a pas d'alternative à l'utilisation de ce modèle animal. Les animaux sont hébergés dans des conditions d'enrichissement et à plusieurs par cages (maximum 5). Ils sont soumis à une surveillance quotidienne par un animalier et une personne de l'équipe passe au moins une fois par semaine. Il est

important de mieux comprendre pourquoi ces deux types de muscles ne sont pas touchés de la même façon dans ces maladies car cela pourrait permettre de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques.

7950 Le muscle strié squelettique est relié à l'os par le tendon. Ces deux tissus sont très riches en tissu conjonctif, composé de la matrice extracellulaire qui est une structure complexe permettant le maintien de l'architecture et les interactions entre cellules. Nous avons créé un modèle murin présentant des défauts de protéines de la matrice extracellulaire qui développe une myopathie progressive. Ce modèle est particulièrement adapté pour l'étude de tissus complexes comme le muscle squelettique et son interaction avec le tendon, ce qui ne peut pas être reproduit dans des systèmes cellulaires (critère de remplacement). L'objectif de ce projet est d'utiliser une technologie non invasive, non traumatique (critère de raffinement), sur les mêmes animaux (ce qui permet la réduction du nombre d'animaux), les propriétés viscoélastiques, et notamment la rigidité, du muscle squelettique et du tendon, au cours de la vie. A ce jour cette technique innovante n'est que peu utilisée dans le domaine musculaire, et encore moins chez la souris ce qui rend ce projet tout à fait innovant.

Le projet permettra d'étudier l'évolution naturelle de la maladie et de valider un paramètre quantitatif pour l'efficacité fonctionnelle des thérapies que nous développons.

Ce projet nécessite l'utilisation d'animaux (252 au total) à des âges différents (3 à 24 mois) ainsi que des animaux issus d'autres protocoles. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, nous n'utilisons que des animaux sauvages et homozygotes mutants (pas les hétérozygotes qui présentent un phénotype intermédiaire), issus des mêmes portées, indifféremment mâles et femelles.

7951 Le système lymphatique a pour but de drainer des fluides tissulaires afin de les ramener à la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière. Il est impliqué dans le transport des graisses et des macromolécules et joue un rôle important dans l'immunité en transportant les cellules de l'inflammation.

Le réseau lymphatique est également impliqué dans de nombreuses pathologies telles que le lymphœdème, le psoriasis, la polyarthrite rhumatoïde et dans la dissémination métastatique.

Le lymphœdème est le résultat d'une obstruction ou d'une perturbation du système lymphatique provoquant l'accumulation de fluide dans les tissus interstitiels. Le lymphœdème est une pathologie douloureuse et handicapante, qui survient après la chirurgie du cancer, cependant aucune thérapie visant la régulation du dysfonctionnement de ce réseau lymphatique n'est proposée.

Un des raisons pour lesquelles très peu d'études sont réalisées sur cette pathologie qui touche environ 15% des femmes ayant eu un cancer du sein, réside dans le fait que très peu de modèles animaux sont proposés : seul un modèle de blessure de la queue de souris est actuellement utilisé dans la littérature.

Dans cette étude, nous proposons de reproduire le lymphoedème secondaire de la femme dans un modèle animal chez la souris. Cette étude nécessitera l'expérimentation sur 180 animaux. En effet, le lymphoedème étant une maladie faisant intervenir le système circulatoire lymphatique, le tissu adipeux du bras, ainsi que l'ensemble des composantes de la peau, il est nécessaire d'étudier cette maladie dans un organisme vivant mettant en jeu ces trois tissus. Dans un deuxième temps nous allons tester l'effet des principales chimiothérapies du cancer du sein, ainsi que les hormonothérapies sur l'incidence et le développement de cette pathologie.

Nous travaillons dans le respect des 3R "Remplacer, Réduire, Raffiner". Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellules, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour avoir un test statistique permettant de tirer une conclusion, nous raffinons les conditions de vie de l'animal en limitant le nombre d'animaux par cage, et en adaptant ce nombre selon leur comportement. Les animaux sont examinés cliniquement bi quotidiennement ou plus fréquemment en fonction de leur état. Les changes des cages sont effectués une fois par semaine ou plus si besoin afin d'avoir une litière propre, et qu'il y ait suffisamment d'eau à boire et d'aliments. Pour éviter la douleur nous utilisons des anesthésiques et des antalgiques dès que c'est nécessaire.

7952 Le système immunitaire désigne un ensemble de cellules qui vont coopérer ensemble pour défendre l'organisme contre des microbes comme les bactéries, champignons ou virus. Nous examinons en détail les propriétés d'un type de cellules du système immunitaire, les lymphocytes T CD4. Ces cellules agissent comme des chefs d'orchestre. En effet, pour être efficaces, les cellules du système immunitaire ont besoin de communiquer entre elles. Jouant ce rôle de « chef », les lymphocytes T CD4 libèrent des signaux moléculaires qui vont activer d'autres cellules immunitaires pour éliminer la source du danger. Certains sous-types de cellules T CD4 peuvent directement lutter contre le développement de cellules cancéreuses. Malheureusement, au sein d'une tumeur cancéreuse, ces cellules sont peu nombreuses et – pire encore - les cellules cancéreuses sont capables de neutraliser les effets anti-cancéreux de ces T CD4. Notre objectif est donc d'isoler ces cellules T CD4, de les multiplier *in vitro* (dans des boîtes de culture) et d'augmenter fortement leurs propriétés anticancéreuses. Elles pourront ensuite être utilisées comme outil thérapeutique dans la lutte contre le cancer. Bien que la preuve de principe de l'efficacité anticancéreuse d'un transfert de lymphocytes T CD4 a été établie chez l'homme, il n'existe pas encore de protocole de transfert de lymphocytes T CD4 qui soit approuvé pour une utilisation en clinique, ce qui suggère qu'une meilleure connaissance de la biologie des lymphocytes T CD4 est requise afin d'optimiser cette approche thérapeutique et de la rendre applicable chez l'homme.

Afin que les résultats de notre étude puissent être transposés à des situations cliniques, dans lesquelles des patients atteints de cancer reçoivent des cellules T activées dans des boîtes de culture, le recours au modèle animal ne peut être évité. Dans ce projet, nous nous proposons d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de cellules T CD4 dans un modèle murin de cancer de la peau. Pour cela, nous allons traiter dans des boîtes de culture les cellules T CD4 avec différentes molécules qui vont affecter leur activité puis injecter ces cellules chez des animaux porteurs de cancer de la peau. Le nombre d'animaux par expérience chez des souris porteuses de tumeurs a été réduit à 5 souris par groupe au lieu de 8. Au total, 448 souris seront utilisées dans ce projet. Les souris maintenues en groupe pour favoriser la socialisation seront placées dans un environnement calme avec enrichissement structural du milieu. Enfin, les souris porteuses de tumeurs seront surveillées régulièrement afin d'éviter l'apparition de souffrance.

7953 Les traitements anti-angiogéniques sont utilisés en thérapie cancéreuse pour cibler la vascularisation de tumeurs. Ils combattent la croissance tumorale en empêchant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Le médulloblastome est la plus fréquente des tumeurs primitives neuro-ectodermiques. Elle se développe dans le cervelet, le plus souvent au niveau du vermis. Il s'agit d'une tumeur maligne invasive et peut métastaser dans la totalité du système nerveux central, par la voie du liquide céphalo-rachidien. Sur le médulloblastome, cancer touchant majoritairement de jeunes enfants dans la tranche d'âge 4-10 ans, les traitements anti-angiogéniques ont montré une efficacité sur ce type de cancer dans des expériences *ex-vivo*. Cependant, la toxicité de ces traitements sur de jeunes individus n'a pas été testée. L'objectif de l'étude est d'administrer par gavage quotidien un composé anti-angiogénique chez des rats juvéniles afin de voir si un impact toxicologique est observé sur des organismes en cours de croissance. Le nombre total d'animaux est de 24 rats Wistar âgés de 20 jours. La règle des 3R est appliquée ici pour les principes de réduction et de raffinement. Les animaux sont hébergés en groupe dans des cages contenant de l'enrichissement. Le gavage est réalisé par le même personnel compétent dans la contention et le gavage pour limiter le stress induit par la procédure. La procédure standard de gavage chez le rat est respectée afin d'éviter la souffrance et de limiter l'inconfort des animaux. L'équipement utilisé est adapté aux rats et le volume d'administration est adapté au poids des rats. Les points limites sont observés tout au long des procédures. De plus, une observation des animaux est réalisée quotidiennement pour détecter et traiter éventuellement tout signe de douleur. Tout animal qui présenterait une perte d'état général sévère sera mis à mort selon une méthode recommandée par la réglementation et approuvée par le comité d'éthique et la structure bien-être animal.

7954 L'hystérosalpingographie est un examen radiographique (aux rayons X) de l'utérus et des trompes utérines généralement indiqué dans les bilans de stérilité afin de vérifier la perméabilité des trompes et la normalité de la cavité utérine.

Elle consiste en une instillation de produit de contraste iodé (radio opaque) dans l'utérus et les trompes via une canule accolée au col de l'utérus. L'absence de passage du produit de contraste depuis les trompes de Fallope dans la cavité péritonéale signe une obstruction tubaire. Cette obstruction tubaire rend compte d'une infertilité féminine dans 35% des cas.

Des travaux cliniques ont montré que l'hystérosalpingographie, quand elle est réalisée au moyen de l'injection d'une huile iodée, le Lipiodol, se traduit par une augmentation de la fertilité par rapport à la même technique réalisée au moyen de produits de contraste iodés hydrosolubles. Ce phénomène a été observé en l'absence ou en présence d'une endométriose. Le mécanisme de cet effet n'est pas connu. Il existe quelques hypothèses dans la littérature. L'objet de ce projet est l'élucidation de ce mécanisme et des éventuelles conséquences endocrinologiques (thyroïdiennes notamment) de l'administration d'un produit iodé hydrosoluble ou huileux. Des études mécanistiques ont déjà été effectuées *in vitro*.

Notre espèce de choix est le rat car il est classiquement utilisé dans les études de fertilité (réglementaire).

Si la mise au point du modèle n'est pas possible chez le rat ou s'il n'est pas adapté par rapport à nos objectifs, nous pourrions effectuer des études chez la souris ou le Lapin, comme cela a pu être fait dans la littérature. Ce sont également des espèces utilisées classiquement dans les études de reproduction.

Le projet complet nécessitera l'utilisation de 500 rats ou souris sur 5 ans et de 500 lapins sur 5 ans. Le nombre d'animaux par lot dépendra des résultats des études préliminaires de mise au point et tiendra compte de la puissance statistique nécessaire afin de conclure.

Les procédures expérimentales mises en œuvre seront réalisées sous anesthésie et analgésie, gazeuse ou chimique (sauf le cas contraire si l'anesthésie/analgésie n'est pas compatible avec la procédure et si celle-ci n'induit pas de souffrance/angoisse).

Les résultats acquis chez un même animal permettront de répondre à plusieurs questions scientifiques (pharmacocinétique, biodistribution, imagerie, tolérance, efficacité) afin de raffiner le protocole. 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 en vigueur.

Ces études s'inscrivent dans un programme de recherche de l'amélioration de la fertilité féminine.

7955 Chlamydia trachomatis est une bactérie responsable d'infections génitales et oculaires qui représentent un problème majeur de santé publique. En effet, cette infection est la première maladie bactérienne sexuellement transmissible dans les pays industrialisés, avec une prévalence estimée entre 2 et 10 % chez les sujets jeunes. Chlamydia trachomatis est le principal agent responsable des urétrites chez l'homme et des cervicites chez la femme. La rectite à Chlamydia trachomatis est un diagnostic fréquemment retrouvé chez les patients ayant des relations sexuelles avec d'autres hommes. Elle correspond à la phase primaire de la lymphogranulomatose vénérienne, une maladie systémique grave aux complications sévères, en recrudescence ces dernières années. De nombreuses complications graves ont également été rapportées chez la femme jeune, avec des conséquences sur la fertilité et un risque de stérilité. Non-traitées, les infections génitales à Chlamydia trachomatis augmentent le risque de transmission du Virus de l'Immunodéficience Humaine et des autres infections sexuellement transmissibles. Cette bactérie est également responsable du trachome, une maladie oculaire connue depuis l'Antiquité, qui est la première cause de cécité dans le monde.

La fréquence élevée du portage asymptomatique et son risque de transmission à « bas bruit », associés aux conséquences graves de l'infection sur la fertilité, la vision et la transmission du VIH, rendent capitale l'évaluation de stratégies préventives afin de protéger les populations à risque et ainsi de limiter la propagation de cet agent pathogène chez les sujets jeunes les plus fortement exposés.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'immunogénicité et l'efficacité de nouvelles stratégies vaccinales ainsi que de développer une nouvelle approche de prophylaxie médicamenteuse chez un modèle de primate non humain. L'efficacité préventive de ces nouvelles stratégies sera évaluée dans des

modèles expérimentaux d'infections génitales et oculaires à *Chlamydia trachomatis* utilisant des souches bactériennes impliquées en pathologie humaine. Ce projet s'inscrit dans le cadre d'un programme de recherche européen dont l'objectif est d'améliorer les connaissances scientifiques dans le domaine de la vaccinologie pour développer une nouvelle génération de vaccins plus efficaces. Les résultats de ce projet pourraient conduire à la mise en place d'essais cliniques.

Le primate non humain choisi pour ce projet est le modèle le plus pertinent pour corréler les données d'immunogénicité et d'efficacité à ceux qui seront obtenus chez l'Homme et, pour évaluer l'efficacité d'une prophylaxie médicamenteuse dans des conditions métaboliques proches de l'homme.

Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été réduit au minimum nécessaire tout en restant compatible avec l'utilisation de tests statistiques pour permettre l'interprétation des résultats. Le projet prévoit d'utiliser au maximum 186 animaux nés et élevés dans des élevages reconnus.

Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux (administration vaccinale et médicamenteuse / prélèvements / inoculations bactériennes sous anesthésie, limitation des volumes prélevés). Des critères d'arrêt sont prévus dans le projet afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus. En cas d'apparition de signes inattendus, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés.

7956 Les surexpositions accidentelles aux rayonnements ionisants concernent différentes catégories de personnes (travailleurs, patients, public). Ces expositions peuvent être individuelles lors d'accident radiologique ou au contraire de grande ampleur lors d'acte de malveillance. Par conséquent, des outils permettant un tri des patients et par conséquent détecter ceux qui nécessitent une prise en charge et les suivre à long terme doivent être développés.

Le but du projet est de déterminer si les cellules du système immunitaire peuvent être des marqueurs de tris et de pronostics pour le développement des complications après exposition accidentelles aux rayonnements ionisants. Cette approche permettrait rapidement et de façon non invasive de diagnostiquer et trier les patients.

Pour évaluer notre hypothèse dans les conditions physiologiques, nous sommes dans l'obligation d'utiliser un modèle *in vivo*, afin de permettre une évaluation au niveau d'un organisme dans son ensemble. La lésion tissulaire sera réalisée au niveau de la peau ou de la patte de l'animal anesthésié au préalable. L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques. Ces modèles *in vivo* permettent de modéliser les lésions tissulaires observables chez l'homme. L'évaluation des paramètres physiologiques se feront sur des prélèvements réalisés sur des animaux anesthésiés avant euthanasie. Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 354.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour obtenir des résultats pertinents.

Les études moléculaires et cellulaires se feront sur des prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

7957 Pour le développement de nouveaux médicaments ou la recherche de nouvelles cibles thérapeutiques, il est nécessaire d'étudier le devenir de la substance active ou de la sonde dans l'organisme, déterminer l'absorption, la distribution, le métabolisme et l'élimination du composé (ADME), des propriétés qui vont influencer la posologie du médicament (dose administrée et fréquence d'administration) ou permettre la mise en évidence du devenir de la sonde et in fine la localisation in-situ de cible.

L'objectif de ce projet est la mesure de la biodistribution de produits pharmacologiques (candidats-médicaments) et de sonde en cours de développement chez la souris.

Adéquation avec la règle des 3R

Remplacer

Pour réaliser ce projet, nous utiliserons la souris, car cette espèce animale est la plus utilisée dans le développement de médicaments. A ce jour, aucun modèle alternatif n'est suffisamment intégré et

complexe pour permettre d'évaluer la distribution d'une molécule, qui met en jeu les mécanismes de dégradation, de transport et d'élimination des composés susceptibles d'affecter l'activité des molécules. Pour cette raison, une approche *in vivo* est nécessaire pour déterminer la biodisponibilité des nouveaux candidats-médicaments et des sondes avant de poursuivre leur développement.

Raffiner

La procédure expérimentale est conçue pour garantir le bien-être de l'animal et réduire au maximum l'inconfort, le stress et la souffrance. La souris étant un animal social, les souris seront maintenues par groupes de 3 à 4, dans des cages enrichies de tubes en carton. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, de la nourriture et de l'état des animaux.

La douleur liée aux injections est une douleur ponctuelle réversible qui fera l'objet d'une surveillance de l'animal. Les animaux seront particulièrement surveillés après l'administration des candidats-médicaments ou des sondes, pour visualiser tout signe de toxicité imprévue qui nécessiterait la mise à mort de l'animal.

Réduire

La réalisation des procédures par un technicien rompu à ces manipulations garantit une bonne reproductibilité et permet de limiter le nombre d'animaux à engager dans les protocoles. Nous avons montré que la procédure expérimentale parfaitement maîtrisée permet une mesure efficace à l'aide de 3 souris par condition testées. Le plus souvent 2 à 5 conditions seront testées pour un composé (doses, voie d'administration, en présence ou absence d'un compétiteur).

Il est prévu de mesurer la biodisponibilité de 5 candidats-médicaments ou sondes par an chez la souris (30 à 75 souris) sur une période de 5 ans, soit un maximum de 375 souris.

7958 Les troubles anxieux et les troubles liés à l'anxiété sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, on estime que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, l'anxiété est impliquée dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France.

Au plan des traitements, l'arsenal pharmacologique disponible concernant l'anxiété présente de nombreuses limitations de par les effets secondaires importants et/ou l'efficacité limitée de ces molécules. Dans ce contexte, la recherche de nouveaux produits plus efficaces représente donc un enjeu sociétal et économique majeur. La prévention de l'anxiété par exemple à l'aide de techniques favorisant la relaxation ou par des facteurs nutritionnels semble également une approche alternative prometteuse.

Le test de l'enfouissement défensif conditionné (EDC) est l'un des tests permettant d'évaluer l'anxiété chez le rongeur. Ce test est notamment connu pour sa sensibilité à la plupart des anxiolytiques (agents pharmacologiques qui réduisent l'anxiété) efficaces chez l'Homme. C'est donc un outil de choix pour l'évaluation de nouveaux traitements.

Dans cette situation standard, le rat est placé dans un environnement connu dans lequel un élément nouveau a été ajouté : une électrode qui délivre un seul et unique choc électrique lors du premier contact de l'animal avec l'une de ses pattes. En réaction, le rat projette la sciure disposée sur le sol vers l'électrode. Ce comportement d'enfouissement est directement corrélé au niveau d'anxiété des rats. Ainsi, les produits qui présentent des propriétés de type anxiolytiques réduisent la durée d'enfouissement.

Cependant bien que le choc électrique ne soit pas douloureux, nous souhaitons supprimer cette méthode d'induction, au profit d'une induction plus éthique (Raffinement). Un nouveau dispositif doit donc être développé. Ce nouveau dispositif utilisera une sonde vibrante à base fréquence couplée à l'émission d'ultrasons, association de ces deux stimuli qui devrait déclencher le comportement d'enfouissement.

Le comportement des animaux dans ce test devrait être sensible aux conditions d'applications du test. Les facteurs connus pour faire varier le comportement des animaux sont l'intensité et le nombre de

signal des ultrasons, le protocole d'habituation au dispositif, la souche de rat, la mise à jeun préalable au test. La maîtrise de ces facteurs est déterminante pour la qualité et la reproductibilité des études qui seront réalisées ultérieurement dans ce modèle. En effet, l'efficacité de nouveaux traitements potentiels peut ne pas être détectée si les animaux sont dans un état d'anxiété trop faible ou trop élevé, ou si leur comportement est trop variable.

Dans ce projet, 117 rats seront utilisés : 21 rats mâles Wistar au maximum seront tout d'abord utilisés pour vérifier que le couplage des stimuli vibration/ultrasons est capable de déclencher un comportement d'enfouissement et si les résultats sont positifs, les 96 autres animaux, 48 rats mâles Wistar et 48 rats Long-Evans, serviront à optimiser et définir les paramètres environnementaux optimaux permettant le raffinement du protocole. L'utilisation d'un plan expérimental permettra de tester différentes variables (10 au total) avec un nombre réduit d'animaux (Réduction).

Chaque rat sera gavé avec de l'eau de source par voie orale afin de reproduire les conditions expérimentales des études de Pharmacologie qui seront réalisées par la suite. Les animaux seront habitués au gavage pendant les 3 jours précédents le test, puis recevront un 4ème gavage avec de l'eau de source 1 h avant la mesure de l'anxiété le jour du test de l'EDC. Le volume d'administration effectué avec une sonde de gavage adaptée à la taille des animaux sera de 5 ml/kg (Procédure 1). Les animaux seront placés ou non dans le dispositif expérimental de l'EDC sans la sonde vibrante pendant les 3 jours précédents le test et le jour du test ils seront placés individuellement dans le dispositif en présence de la sonde vibrante, avant d'être soumis aux stimuli d'induction dès le premier contact avec la sonde vibrante (Procédure 2).

Les animaux seront hébergés par 3 dans des cages ouvertes de 1300 cm² de surface, 18 cm de hauteur et placés en cycle de lumière inversé (lumière de 19h à 7h) et disposeront de briques d'Aspen comme enrichissement du milieu (Raffinement). Ils seront manipulés sous une lumière rouge non-perceptible par les rongeurs durant leur phase d'activité naturelle (phase nocturne).

Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la sortie de l'étude et la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques.

L'utilisation d'animaux est indispensable pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests *in vitro* ou *in silico*) (Remplacement).

7959 L'hypertension artérielle est une cause majeure de mortalité et de morbidité dans les pays industrialisés. C'est un important facteur de risque cardiovasculaire, neurologique et rénal. Le rein adapte quotidiennement l'excrétion urinaire de chlorure de sodium aux apports alimentaires de manière à maintenir une homéostasie parfaite du chlorure de sodium dans l'organisme. L'incapacité du rein à réguler correctement la balance sodée entraînant une rétention sodée, est à l'origine d'une augmentation de la pression artérielle. Dans la partie terminale du néphron (tubule contourné distal, tubule connecteur et canal collecteur), la régulation de la réabsorption de sodium permet de modifier l'excrétion urinaire de sodium et de chlore. Les protéines membranaires (canaux, pompes, co transporteurs) transportant le chlore et le sodium commencent à être bien connues. Plusieurs mutations d'un canal chlore, CLC-Kb, est décrit chez l'homme et dans des modèles murins comme étant à l'origine du syndrome de Bartter. C'est un syndrome qui s'associe à une perte rénale de chlorure de sodium, une alcalose métabolique et une hypotension. La concentration de prostaglandine PGE₂ est extrêmement élevée dans les urines de ces patients et l'utilisation d'indométhacine (anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS)), inhibiteur de la synthèse des prostaglandines, permet de résorber la plupart des troubles associées à ce syndrome. Pour autant, l'utilisation d'AINS a des effets secondaires rénaux importants particulièrement sur la microcirculation sanguine rénale et un traitement au long court peut être délétère. Dans certaines situations comme la déshydratation, l'utilisation d'AINS est contre-indiqué. La première partie de ce projet a pour objectif de caractériser un nouveau modèle murin dont l'inactivation du canal chlore pourra être induite à des temps précis (jeune adulte, adulte). Ce projet permettra d'une part de mieux comprendre les mécanismes qui entraînent une synthèse accrue de prostaglandines dans le syndrome de Bartter et d'autre part d'évaluer si l'inhibition du canal chlore CLC-Kb pourrait être une cible potentielle pour de futurs traitement anti hypertenseur.

La souris est le seul modèle animal dont l'inactivation génique est particulièrement bien caractérisée. Ceci en fait un modèle de choix pour étudier l'implication d'une voie de transduction, une protéine ou un système hormonal dans la régulation physiologique de la balance sodée et de l'état acido-basique. Le recours à des méthodes alternatives a été envisagé mais l'étude de paramètres biologiques comme la pression artérielle ou la balance acido-basique se situe à un niveau d'intégration tel que le recours à l'animal est nécessaire. Un bon modèle cellulaire n'est pas disponible pour les cellules rénales

Nous estimons au total que 104 souris seront nécessaires afin de faire une étude cinétique et statistique pour un programme de recherche de 3ans. Nous adapterons le nombre d'animaux à la baisse dans le respect de la règle des 3R si les protocoles ou les résultats de nos expériences le permettent. Un enrichissement de l'environnement des animaux sera également entrepris et un suivi quotidien des animaux sera effectué avec la mise en place de points limites.

7960 La formation des personnels appliquant les procédures expérimentales sur les animaux ou assurant leur soin est un point fondamental pour garantir la bientraitance et donc le bien-être de ces animaux. En complément des formations réglementaires spécifiques, obligatoires pour tous les personnels impliqués dans les procédures expérimentales, il est important de former les personnels sur la façon d'approcher un animal, d'interagir avec lui et de réaliser des gestes techniques de base (prélèvement sanguin, injections sous-cutanée ou intrapéritonéale, suivi d'une anesthésie.) en induisant un minimum de stress pour l'animal. Ce projet concerne la réalisation de travaux pratiques sur les rongeurs (souris et rats) dans le cadre d'une formation continue professionnalisant. La formation s'adresse à l'ensemble des personnels amenés à manipuler des animaux dans le cadre de projets scientifiques qui souhaitent consolider leurs connaissances par un apprentissage pratique. Le plan de la formation s'appuie sur une partie théorique complétée par une partie pratique. La formation prévoit des groupes de 20 personnes maximum et 4 sessions de travaux pratiques par an. Les participants apprendront des gestes techniques de base pour la manipulation des rongeurs ainsi que l'administration de substances, les prélèvements sanguins, l'anesthésie, l'euthanasie et les techniques de dissection post-mortem. Pour chaque séance de TP, un formateur expérimenté encadrera 5 stagiaires pour les aider à apprendre et réaliser les gestes pratiques. Ces travaux pratiques nécessitent l'utilisation d'animaux car il s'agit d'apprendre à les manipuler selon les bonnes pratiques et s'adressent aux professionnels impliqués dans les études. Les animaux utilisés seront exclusivement des animaux de réforme de l'animalerie de l'établissement où se déroule la formation. 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, des tunnels en cartons et bâtonnets à ronger). Ce projet utilise 96 rongeurs par an (48 rats et 48 souris). Sur les 5 ans prévus de cet enseignement le nombre maximal d'animaux utilisés est estimé à 480.

7961 Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde, en particulier les cardiopathies ischémiques. L'une des approches thérapeutiques les plus efficaces en cas d'insuffisance coronarienne, est la réalisation d'un pontage vasculaire pour restaurer la circulation sanguine adaptée à l'aide d'autogreffes artérielles ou veineuses. Toutefois, ces autogreffes peuvent être limitées du fait du manque de leur disponibilité. Par ailleurs, leur récupération est souvent traumatisante. C'est le cas, par exemple, en particulier du prélèvement des artères mammaires, gold standard pour le pontage coronarien, dont la procédure nécessite une approche délicate et lourde pouvant impacter l'intégrité des tissus environnants.

De plus, l'inefficacité des greffons hétérologues et autres substituts synthétiques contribue au défi de l'ingénierie vasculaire.

Les limites des greffons vasculaires de faible diamètre sont donc un réel frein aux pontages coronariens et se révèlent être un véritable enjeu de santé publique.

Ce projet propose, pour répondre à ce manque de vaisseau naturel de petit calibre et d'origine humaine, de valoriser des artères ombilicales, (isolées à partir des cordons) qui seront refunctionalisées grâce à l'ingénierie tissulaire (avec des cellules souches). En effet, nous avons déjà mené des études pour tester le concept d'ingénierie tissulaire associant ces artères humaines à des cellules souches mésenchymateuses humaines. Les récentes études de faisabilité ont montré

une bonne intégration tissulaire, un excellent comportement hémodynamique dans le modèle carotidien chez le lapin. Ces résultats encouragent une investigation à plus large échelle sur des modèles plus proches de l'humain. Leur usage comme substitut carotidien pour le pontage coronaire semble être adéquat pour tester ce concept. C'est ainsi qu'une approche analytique chez un modèle gros animal plus proche de la situation clinique souhaitée est nécessaire.

L'objectif principal de ce travail est donc de valider sur le cochon, l'efficacité et la perméabilité de ce greffon vasculaire comme substitut coronarien, et de vérifier ses performances en conditions drastiques (test à l'effort), en vue de déposer un dossier d'évaluation clinique.

Ce projet utilisera 16 cochons (50-60kg). Sous anesthésie générale, le pontage coronaire sera réalisé par chirurgie mini-invasive grâce à l'assistance du robot de chirurgie Da Vinci Si. Le greffon sera ponté au niveau de la coronaire intraventriculaire antérieure et l'aorte à cœur battant. Pour mettre de valider le greffon, le réseau normal d'alimentation du cœur sera schinté (ligature de l'artère coronaire). Raffinement des méthodes : Les animaux seront traités avec les mêmes posologies médicamenteuses qu'en clinique humaine. Un contrôle de la perméabilité sera effectué à 3 (pour 8 cochons) et 6 semaines (pour 8 autres cochons) post-pontage. Le nombre d'animaux a été calculé de façon à obtenir des résultats exploitables.

Nous avons établi des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins et les méthodes utilisées (opération mini-invasive) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique permettent ainsi un raffinement de la méthodologie.

7962 L'hyperplasie bénigne de la prostate (ou adénome prostatique) touche un homme sur deux à l'âge de 50 ans, et sa prévalence augmente encore avec l'âge. Bien que cette pathologie ne représente pas un facteur de risque de développer un cancer prostatique, elle altère le confort de vie des patients (troubles urinaires notamment). Outre l'ablation chirurgicale de l'adénome, qui conduit à des effets secondaires gênants chez de nombreux patients (troubles sexuels), les thérapies actuelles incluent des molécules pharmacologiques inhibant l'action des androgènes (hormones mâles qui stimulent la croissance prostatique) ou des extraits de plantes. L'inflammation du tissu prostatique est une des causes aggravantes de l'évolution de la pathologie, néanmoins l'action des traitements médicamenteux (anti- androgènes ou phyto-thérapeutiques) sur ce paramètre demeure mal connue. Il existe un modèle de souris transgéniques présentant une hyperplasie de la prostate, dont les caractéristiques sont semblables à celles observées chez l'homme, mais dont le phénotype n'est pas dommageable.

D'autre part, il a été montré qu'un extrait de plante, le palmier nain, avait un effet bénéfique sur l'hyperplasie bénigne de la prostate de ces souris, incluant notamment un effet anti-inflammatoire et anti-prolifératif sur la prostate hyperplasique. La molécule pharmaceutique que nous allons tester est un extrait de plante potentiellement plus efficace que celui précité car elle est associée à un autre composé actif issu de la racine de la grande ortie.

L'objectif de ce projet est d'utiliser le même protocole qu'utilisé précédemment afin de caractériser l'effet thérapeutique de cette molécule dans ce modèle de souris, et notamment son action sur l'inflammation. La molécule d'intérêt sera administrée quotidiennement par gavage sur une durée de 28 jours. L'excipient ("véhicule"), ainsi que la molécule anti-androgénique de référence utilisée également chez les patients, seront administrés séparément à des groupes d'animaux contrôles selon le même protocole. Tous les animaux seront euthanasiés au terme des 28 jours de traitement afin de récupérer la prostate.

La pathologie étudiée impliquant des interactions entre plusieurs types cellulaires (cellules prostatiques, cellules de soutien de type fibroblastes, cellules immunitaires), il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux par des essais *in vitro* sur cellules. Pour respecter le principe des 3R, le nombre de souris utilisées sera réduit au minimum : analyses de paramètre multiples pour chaque souris et utilisation de tests statistiques adaptés. Pour s'assurer du « bien être » des souris, elles bénéficieront de coton et de « maisons » en carton afin de les occuper et afin qu'elles puissent se construire un « nid ». Le suivi régulier des animaux permettra d'éviter les souffrances de l'animal liées

au traitement. Des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ce projet de 2 ans utilisera 84 animaux.

7963 La maladie d'Alzheimer est la première cause de démence dans le monde. De nos jours, son diagnostic est tardif et peu spécifique puisqu'il se base sur la recherche de ses symptômes cliniques. Or, il est maintenant reconnu que les modifications cérébrales caractéristiques de cette pathologie apparaissent de façon précoce dans le cerveau des patients, plusieurs années avant l'apparition des signes cliniques. Il existe donc un besoin urgent de développer des biomarqueurs d'imagerie pour mesurer ces modifications. Ces nouveaux outils non invasifs occupent une place croissante dans le diagnostic précoce et le suivi de la progression de la maladie, ainsi qu'en recherche pour la mise au point de nouvelles voies thérapeutiques.

Les lésions cérébrales caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (les plaques amyloïdes composées de peptides beta-amyloïdes et les dégénérescences neuro-fibrillaires composées de protéines Tau) peuvent être détectées dans le cerveau des patients par tomographie par émission de positons (TEP). Cependant, la nécessité de recourir à la radioactivité, la faible résolution spatiale et le coût de cette technique limitent son utilisation en pratique clinique courante. L'imagerie par résonance magnétique (IRM), technique non irradiante, à haute résolution spatiale et peu coûteuse, est une alternative séduisante pour l'imagerie des lésions de la maladie d'Alzheimer.

Depuis une dizaine d'années, des efforts ont été faits pour détecter les plaques amyloïdes par IRM notamment à l'aide d'agents de contraste ciblant spécifiquement ces lésions. Cependant, leur utilisation pour l'imagerie des plaques amyloïdes est limitée principalement par la présence de la barrière hémato-encéphalique. Cette barrière sépare la circulation sanguine et le cerveau et empêche de nombreux organismes - ainsi que des molécules thérapeutiques - d'atteindre ce dernier. D'autre part, aucune méthode n'est disponible pour la détection des dégénérescences neurofibrillaires.

Notre projet est de développer deux techniques complémentaires pour détecter les lésions de la maladie d'Alzheimer. L'une permettrait d'imager de façon spécifique et précoce les lésions de la maladie d'Alzheimer par IRM à l'aide d'agents de contraste innovants. Ces derniers sont à base d'anticorps de camelidés, plus petits que les anticorps humains, et ont la capacité de traverser spontanément la barrière hémato-encéphalique. Notre laboratoire a montré *in vitro* (échantillons de cerveaux de malades et de modèles murins de la maladie d'Alzheimer) qu'ils peuvent se fixer sur des lésions spécifiques de la maladie d'Alzheimer. L'autre technique, complémentaire, repose sur l'administration d'agents de contraste IRM non ciblés. Notre objectif est de pouvoir continuer le développement de ces techniques d'imageries *in vivo* sur des modèles de rongeur. Le recours au modèle animal est ici nécessaire, car aucun milieu de culture ou système synthétique ne permet aujourd'hui de reproduire la complexité d'un organisme vivant notamment les interactions complexes entre le sang et le cerveau au niveau de la barrière hémato-encéphalique. Ces techniques d'imagerie sont non invasives pour l'animal. Les animaux anesthésiés recevront au préalable une injection d'agent de contraste par voie intraveineuse ou intracérébrale avant d'être imagés par IRM.

Toutes les interventions sur les animaux se feront après anesthésie et sous analgésie. Leurs protocoles ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet proviennent d'élevages agréés. Leur nombre de 745 individus a été réduit au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences qui seront menées pendant les 5 années de l'étude.

Une attention particulière au bien-être des animaux est apportée pour leur hébergement toujours en groupe. Un enrichissement est ajouté à leur environnement pour multiplier leurs activités tout en respectant leur mode de vie.

7964 Comme n'importe quel autre caractère, le sommeil a été sculpté par l'évolution et existe ainsi sous différents phénotypes chez les animaux. Chez les mammifères et les oiseaux tous deux homéothermes (animaux à « sang chaud »), le sommeil est classiquement divisé en deux états, le sommeil lent et le sommeil paradoxal. Ces deux états sont souvent caractérisés et différenciés à partir de critères comme l'activité cérébrale, la physiologie et le comportement. Le but de ce projet est de décrire le sommeil chez les squamates (lézards et serpents), un groupe partageant un ancêtre commun avec les mammifères et les oiseaux. En étudiant ce groupe négligé pour l'analyse du

sommeil, nous souhaitons comprendre les origines du sommeil lent et du sommeil paradoxal et ainsi déterminer si ces deux états sont apparus ou non en même temps que l'homéothermie. Nous allons utiliser différentes techniques d'imagerie, afin d'implanter avec précision des électrodes intracérébrales et d'être spécifiques à chaque animal. En utilisant un système sans fil, nous allons quantifier tous les aspects principaux du sommeil. Nous enregistrerons 24h/24h, l'activité de plusieurs régions cérébrales ainsi que tous les paramètres physiologiques et comportementaux covariant avec le sommeil lent et le sommeil paradoxal chez les mammifères. Cette approche multidisciplinaire nous permettra d'obtenir de nouvelles données pour comprendre les origines des deux états de sommeil et ainsi apporter des informations importantes pour décrypter le rôle du sommeil, encore largement méconnu.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1)Remplacement :

Le sommeil est un phénomène comportemental et physiologique complexe non modélisable. De fait l'utilisation du modèle animal est incontournable. Il n'existe donc aucune méthode alternative à la réalisation de ce projet.

2)Réduction :

Toutes les procédures expérimentales qui seront mises en œuvre ont été optimisées statistiquement, de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux (n=36) et obtenir un résultat significatif. Outre le nombre minimal statistique, l'utilisation de technique d'imagerie non invasive (IRM), ainsi que la maîtrise des procédures permet l'obtention de résultats sur la quasi-totalité des effectifs, réduisant de fait le nombre d'animaux.

3)Raffinement :

Les études sur le sommeil nécessitent des observations sur des animaux non anesthésiés vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Durant les enregistrements l'animal est libre de ses mouvements dans un grand espace. Le bien-être animal est assuré par la présence de personnel compétent 7J/7 pour l'observation et le soin, garantissant de plus un sommeil naturel et physiologique.

7965 Notre projet s'inscrit dans un contexte actuel de développement de thérapies ciblées contre les cancers du sang. Nous tentons de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires qui régulent le développement normal et pathologique de plusieurs populations cellulaires du sang (dont les cellules souches du sang et les leucémies humaines et en particulier les leucémies d'enfants en rechute) avec le but à long terme d'élaborer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Nous voulons savoir si des perturbations, comme des stress oxydants (par exemple : modification de la concentration en oxygène, irradiations ou présence d'antioxydants), modifient les propriétés des cellules souches du sang. Nous espérons que la présence d'antioxydants dans des milieux de culture permettra d'améliorer les propriétés des cellules souches du sang avec une visée d'application aux protocoles de transplantation de cellules de moelle osseuse chez l'homme. D'un autre côté nous voulons comprendre comment les leucémies interagissent avec la moelle osseuse au cours de leur développement. Ce projet s'inscrit dans un cadre large d'apporter de nouvelles connaissances dans le domaine de la génération des cellules du sang. Il participe aussi à un réseau national, appelé MAPPY-ACT, et à un groupement de laboratoires dans un projet commun du PAIR-Pédiatrie 2017. Les objectifs de la participation du laboratoire à ces réseaux sont de proposer de nouveaux modèles expérimentaux de leucémies de l'enfant et de fournir des moyens à la communauté scientifique et médicale d'explorer de nouveaux médicaments.

Des systèmes de culture sont disponibles pour atteindre certains de ces objectifs et nous les utilisons le plus souvent possible. Mais ils ne reproduisent pas toutes les étapes du développement normal et pathologique des cellules humaines qui se déroulent dans la moelle osseuse ou dans d'autres organes du corps.

Le projet proposé est la prolongation de plusieurs études scientifiques qui ont déjà permis d'acquérir des connaissances et d'élaborer des modèles animaux de cancers humains aujourd'hui utilisés par le monde scientifique. Afin de mieux comprendre les interactions entre les cellules leucémiques et leur environnement, nous proposons aussi le développement de nouveaux modèles permettant la propagation de prélèvements leucémiques humains récalcitrants aux signaux émis par l'environnement de la moelle osseuse de la souris.

Notre étude nécessite des transplantations de cellules souches sanguines qui miment celles qui sont utilisées en traitement de personnes atteintes de maladies du sang dans un modèle de rongeurs génétiquement modifiés. Le but est de comprendre le mécanisme conduisant une cellule normale à devenir leucémique/anormale, de mettre en évidence des sous-populations de cellules leucémiques responsables des rechutes, de tester les effets d'irradiation à des débits de dose variables, notamment proches de ceux qui sont utilisés en radiothérapie, sur le développement leucémique et normal, d'améliorer la conservation des propriétés des cellules souches du sang lors de leur manipulation ex-vivo avant la transplantation.

Le nombre d'animaux a été calculé en tenant compte des mises au point et des résultats des études précédentes. Il est d'un minimum nécessaire de 1742 rongeurs, nés dans des élevages agréés à des fins scientifiques. Les méthodes expérimentales effectuées sous anesthésie, consistent en des injections, des prélèvements (prises de sang et biopsies de moelle osseuse), des irradiations et des tests de molécules thérapeutiques. Une observation quotidienne des animaux est réalisée pendant plusieurs mois. A la moindre manifestation de douleur ou de signes cliniques, l'équipe d'expérimentateurs interviendra rapidement pour éviter toute souffrance par la mise en place de traitement analgésique.

Les animaux sont hébergés en groupe sociaux pour reproduire leur mode de vie. Un enrichissement en modules divers sera distribué dans leurs cages afin d'élargir leurs activités quotidiennes.

7966 La dermatite de contact est une maladie provoquée par des substances au contact de la peau. C'est une maladie sous-diagnostiquée chez le chien car souvent confondu avec d'autres maladies cutanées.

L'objectif de ce projet est de mettre en place plusieurs protocoles pour induire une dermatite de contact à un type d'allergène donné afin d'évaluer l'impact de l'allergène sur l'animal ainsi que la réaction d'hypersensibilité chez le chien.

La dermatite de contact à l'haptène, bien que peu fréquente chez le chien, existe. Ce modèle permettra de confirmer les données démontrées chez l'homme, tant sur le plan de la pathogénie que sur celui du traitement (traitements utilisant les micros ou nanoparticules).

Une dermatite de contact sera mise en place, celles aux protéines comme la protéine de *Dermatophagoides farinae* ou la protéine d'origine alimentaire. D'autres modèles seront également utilisés (comme l'oxazolone). En effet, le chien est la seule espèce animale qui présente une dermatite atopique (DA) spontanée semblable, sur les plans clinique et pathogénique, à celle de l'homme. Contrairement à la dermatite de contact à l'haptène, la DA du chien est extrêmement fréquente, avec des formes graves entraînant une altération profonde de la qualité de la vie du chien ainsi que de celle des propriétaires.

Cette étude permettra, d'une part de vérifier certaines données obtenues uniquement dans le modèle murin expérimental et de tester un traitement basé sur l'application de micro ou nanoparticules. Dans un second temps, cette étude permettra d'approfondir les connaissances de la DA du chien et d'explorer le rôle des allergènes alimentaires dans le déclenchement ou l'aggravation de celle-ci, en particulier la voie de pénétration de l'allergène alimentaire. Enfin, cette étude permettra de tester de nouvelles alternatives thérapeutiques pouvant être une avancée notable par rapport au traitement de référence qu'est la ciclosporine.

A l'heure actuelle, il n'existe pas d'autre méthode permettant d'évaluer l'impact d'une molécule étrangère sur un organisme entier. Cette étude clinique nécessite de travailler sur un modèle animal. En effet, il est possible de mimer la DA spontanée du chien, en réalisant, chez cette espèce, une délamination de la couche cornée juste avant l'application d'un allergène.

Pour ce projet, Il est envisagé d'utiliser au maximum 15 chiens, pour l'obtention de données basales sur la peau et sur la mise au point du modèle afin obtenir une exploitation statistique des résultats.

Ces études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des chiens. Les chiens seront hébergés, individuellement, avec un collier élisabéthain afin d'éviter tout léchage de la zone d'application de la molécule testée, le moins de temps possible. Par ailleurs, les chiens seront quotidiennement sociabilisés et auront à disposition des jouets dans le but d'éviter tout stress. De plus, des mesures seront prises pour prévenir toute atteinte de l'état général des animaux lors du développement de la dermatite de contact.

7967 Le projet « Apprentissage des procédures sur Rongeurs et sur Lapins » permet un enseignement initial aux procédures de base, avec ou sans anesthésie. Ce projet répond à l'obligation réglementaire de formation pour les personnes conduisant des procédures sur animaux vivants utilisés à des fins scientifiques, et notamment les étudiants au cours de leurs parcours de masters ou de PhD. Remplacement : les animaux vivants sont remplacés par des documents audiovisuels lors d'une première initiation des gestes à acquérir, puis par des mannequins ou par des cadavres. L'apprentissage sur animal vivant n'est conduit qu'après ces premières approches. Un animal vivant reste nécessaire pour l'acquisition des gestes de base comme des gestes de précision, selon les bonnes pratiques. Les travaux pratiques permettent d'acquérir les bases concernant :

-l'observation, l'abord, la contention et la manipulation du rat, de la souris de laboratoire et du lapin, de façon à ne provoquer ni peur, ni angoisse, ni souffrance

-l'anesthésie volatile chez le rat et fixe chez la souris, afin de réaliser des procédures de base en toute sécurité, comme l'implantation d'une micropuce ou la réalisation de prélèvements sanguins courants

-l'euthanasie faisant partie intégrante des procédures que les participants doivent acquérir, elle sera pratiquée par chaque participant sous la supervision directe d'un encadrant sur souris anesthésiée.

Réduction : Le nombre d'animaux a été réduit à un animal/stagiaire au maximum, ce qui permet un apprentissage effectif : rats et des souris de 8-10 semaines, à raison d'un animal/stagiaire. Pour le lapin, il s'agit de jeunes adultes à raison d'un lapin pour deux stagiaires. Tous les rats seront réutilisés. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 36 souris, 18 rats et 8 lapins par session, soit 62 animaux par session, avec en général deux sessions par an, et jusqu'à un grand maximum de 4 sessions par an. Le nombre total de sessions sur la durée du projet ne dépassera pas 14, soit un grand maximum de 868 animaux.

Raffinement : L'apprentissage sur animal vivant n'est conduit qu'après une initiation par visualisation de documents audiovisuels et première approche sur mannequin ou sur cadavre.

Les mesures suivantes permettent de diminuer douleur, souffrance, angoisse.

1) Les animaux sont habitués à la manipulation avant le début des Travaux Pratiques (TP)

2) Les animaux restent avec le même groupe social stable dans l'animalerie après chaque séance de TP

3) La méthodologie de l'observation des animaux avant manipulation et les bonnes pratiques de contention (les moins stressantes) sont enseignées.

4) Plusieurs procédures sont enseignées sous anesthésie fixe ou gazeuse : les étudiants réalisent plusieurs types prélèvements sanguins sur animaux anesthésiés par inhalation (rat) ou par injection (souris).

5) Le niveau et la qualité de l'encadrement contribuent au Raffinement dans les séances de TP : tous les encadrants ont validé des diplômes de formation à l'expérimentation animale et sont entraînés à la manipulation des animaux. Le ratio encadrants/étudiants est ainsi de 1/4, ce qui permet l'apprentissage individuel.

7968 Le projet vise à permettre la commercialisation d'une hormone de croissance destinée à optimiser la production des animaux de rente. L'usage zootechnique de cette hormone de croissance est autorisé dans la plupart des pays spécialisés en productions animales. La libération des lots de fabrication de cette hormone de croissance requiert un test biologique chez le rat qui, outre l'autorisation de

commercialisation, permet aussi de contrôler la concentration active. Ce test biologique chez le rat s'effectue chez des femelles dont la fonction hypophysaire spontanée a été supprimée ou des femelles matures dont le poids est stable ; l'hormone de croissance administrée permet donc de compenser une carence induite ou d'induire un gain de poids. Il s'agit là d'un test très codifié et très précis qui répond pleinement aux exigences de la réglementation. Chaque concentration de chaque lot de production est évaluée sur un maximum de 15 rats femelles pour permettre une interprétation statistique discriminante. Compte tenu des besoins en productions animales, le nombre total de rats femelles utilisés est de l'ordre de 13600 animaux sur une période de 5 ans. Les animaux sont hébergés dans un environnement enrichi et font l'objet d'une surveillance quotidienne par un personnel qualifié. En cas de signes cliniques, des mesures appropriées seront prises pour éviter la souffrance des animaux.

7969 Le produit est utilisé pour l'examen radiographique de l'utérus et de ses annexes. Des données tendent à montrer que la fertilité féminine pourrait être améliorée après un tel examen. Les mécanismes possibles ne font que l'objet d'hypothèses (effet mécanique, effet immunologique. ?). Dans le but de revendiquer une autorisation de mise sur le marché de médicament officielle dans cette indication, les autorités françaises de la santé ont accepté la proposition d'une étude de toxicologie, de la tératogénicité et de la reproduction. L'espèce souhaitée est le rat et la voie d'administration intra-utérine. Cette étude est indispensable afin de démontrer l'innocuité du produit et surtout sur la reproduction et l'absence de tératogénicité. L'étude réglementaire utilisera 22 femelles par lot pour les phases de reprotoxicité et 10 femelles par cohorte pour la toxicologie générale, avec deux lots d'animaux (lot témoin et lot traité), soit un total de 194 animaux. Ces nombres sont nécessaires afin de permettre l'obtention de résultats exploitables et correspondent à ce qui est habituellement utilisé pour le développement non-clinique.

Le raffinement sera appliqué à toutes les phases des procédures en conformité avec les recommandations internationales publiées concernant le bien-être animal : nous veillerons aux techniques d'administration pour réduire l'inconfort des animaux, nous appliquerons des points limites précoces pour réduire la souffrance en cas de produits présentant une toxicité et nous procurerons un environnement enrichi (papier kraft, bloc de bois). Les techniques pouvant engendrer du stress, comme un isolement temporaire, seront limitées au minimum, et la douleur sera traitée avec une anesthésie et une analgésie appropriée, sous supervision vétérinaire constante.

Les animaux seront hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet et seront socialisés sauf pendant la période post-opératoire (pour une récupération optimale) et la phase de gestation (pour permettre un suivi individuel de la consommation de nourriture. Cette étude est réalisée dans un objectif de progrès scientifique avec des conséquences positives sur l'Homme. Elles permettent un gain potentiel en terme de connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisés, c'est pourquoi l'intervention des Vétérinaires, du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) est indispensable afin de réduire les dommages en respectant la règle des 3R.

7970 Le fer, élément vital pour l'organisme, est apporté par l'alimentation. Il est indispensable non seulement au niveau cellulaire mais également au niveau systémique pour transporter l'oxygène vers les différents tissus. Si le fer vient à manquer, une anémie apparaît aboutissant à une oxygénation insuffisante des tissus. Inversement, la surcharge en fer peut induire des stress cellulaires (dû à ses propriétés réactives conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène, communément appelées ROS). Les niveaux de fer doivent donc être finement régulés pour éviter toute toxicité ou tout déficit. Le rôle clé de 2 molécules dans la régulation du métabolisme du fer a préalablement été montré. Ces molécules régulent notamment l'absorption du fer au niveau de l'intestin et jouent un rôle essentiel dans la réponse inflammatoire.

Le premier axe de ce projet consistera à définir les rôles physiologiques de ces molécules dans différents organes, impliqués dans l'homéostasie du fer. Dans un second axe, nous étudierons le rôle de ces molécules dans la mise en place de colites inflammatoires et d'inflammation systémique. Le diabète de type 2 étant associé à une inflammation chronique de bas grade, nous allons enfin examiner dans un troisième axe le rôle de ces molécules dans le développement de cette pathologie.

Des expériences préalables *in vitro* ont été réalisées alliant des approches cellulaires et moléculaires afin de limiter le nombre d'animaux utilisés. Toutefois, l'immunométabolisme est complexe et fait intervenir de nombreux organes qui communiquent entre eux. Les molécules que nous étudions agissent simultanément sur différents tissus et leurs rôles ne peuvent donc pas être étudiés uniquement *in vitro*. Pour ce projet, nous utiliserons des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées.

Le phénotype de ces souris génétiquement modifiées n'est pas dommageable. Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 780. Pour respecter le principe des 3R, un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe mais sera toutefois suffisant pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. Les souris seront soumises à des régimes pauvres ou riches en fer ainsi qu'à des régimes gras. Les modèles de colites et d'inflammation systémique seront induits chez les souris déficientes pour nos gènes d'intérêt dans l'intestin.

L'inflammation systémique sera réalisée sur une période de 7 heures afin de limiter de potentielles souffrances. Enfin, ces souris seront également soumises à des traitements antibiotiques pour évaluer l'importance du microbiote dans les différentes pathologies étudiées. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire. Ces études permettront à terme de définir ces molécules comme de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles dans les maladies liées à des dérégulations du métabolisme du fer (hémochromatose, beta-thalassémie, anémie.), de l'inflammation (colites) et dans le diabète de type 2.

7971 De nombreuses études décrivent une augmentation de la prévalence de l'obésité en France et même dans le monde. Ainsi, l'Organisation Mondiale de la Santé indique que le nombre de cas d'obésité a doublé depuis 1980. En 2014, plus de 1,9 milliards d'adultes et 41 millions d'enfants de moins de 5 ans étaient en surpoids ou obèses. À l'échelle mondiale, le surpoids et l'obésité sont liés à davantage de décès que l'insuffisance pondérale. Il s'agit donc d'un réel problème de santé publique et la prévention du surpoids et de l'obésité est donc un défi important qu'il convient de relever dans les années à venir.

La prévention du surpoids et de l'obésité passe par la mise en œuvre durable de politiques permettant d'améliorer les habitudes alimentaires et de favoriser la pratique d'une activité physique dans l'ensemble de la population. Cependant, le développement de nouveaux ingrédients permettant de prévenir la prise de poids pourrait également contribuer à prévenir la prise de poids.

Plusieurs résultats de la littérature indiquent que des extraits végétaux riches en polyphénols permettent de diminuer la prise de poids dans différents modèles animaux.

La société B. a récemment développé des extraits végétaux dont les résultats expérimentaux obtenus *in vitro* suggèrent qu'ils pourraient avoir un effet positif sur la prévention de la prise de poids. Ces résultats et la composition de ces extraits végétaux sont confidentiels car ils pourraient, à terme, faire l'objet d'un dépôt de brevet.

L'objectif du présent projet est de tester *in vivo* l'éventuel effet préventif de ces extraits sur la prise de poids de rates adultes soumises à un régime gras et sucré. Des rates Wistar seront utilisées comme organisme modèle de par les données déjà disponibles dans la littérature et au laboratoire sur l'impact d'un régime gras et sucré chez cette espèce.

Nous proposons d'évaluer l'impact de la consommation de ces extraits végétaux sur la prise de poids et les consommations alimentaires des rates, le bilan lipidique sanguin et la glycémie ainsi que sur la composition corporelle. 65 animaux seront utilisés au total.

Dans un premier temps, une expérience sera réalisée sur 15 animaux afin de tester le potentiel effet préventif sur les paramètres précités de 3 extraits différents. Les doses choisies sont des doses n'entraînant aucun effet secondaire (testée préalablement par la société B., des données pourront être fournies en cas de contrôle) et calculées en fonction de ce qui pourrait, à terme, être administré à l'homme (calcul par rapport aux apports caloriques). En fonction des résultats obtenus lors de la

première expérience, nous réaliserons une deuxième expérience sur 50 rats avec l'extrait le plus efficace que nous utiliserons à 3 doses différentes (recherche d'un effet-dose).

Les besoins nutritionnels des animaux seront couverts et les animaux seront traités selon les règles éthiques de l'expérimentation animale. Le nombre de rats a été évalué pour obtenir des résultats statistiquement exploitables. L'ensemble du projet est mené par un personnel compétent en expérimentation animale.

Les résultats permettront d'évaluer (1) si la consommation de ces extraits végétaux peut permettre de prévenir la prise de poids lors de la consommation d'un régime favorisant cette prise de poids (régime gras et sucré) et (2) la dose permettant d'obtenir le meilleur effet.

7972 Ce projet vise à apporter une réponse pragmatique aux autorités des Malouines qui se posent des questions quant à l'écotoxicité du pétrole brut appelé Sea Lion. La réponse sera obtenue à l'aide d'un test en toxicité aiguë sur le poisson (turbot, *Scophthalmus maximus*) selon la ligne directrice n°203 de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) qui s'appuie sur les tests identifiés par la convention OSPAR (Convention de la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est).

Ce test vise à déterminer la Concentration Létale à 50%, nommée CL50, de l'hydrocarbure à étudier, c'est-à-dire à évaluer la concentration qui provoque la mort de 50% d'une population de juvéniles de turbot (dénombrement de juvéniles de turbot morts au cours du temps lors de la phase d'exposition puis calcul de cette Concentration Létale, CL50, à l'aide du logiciel Regtox).

Compte tenu du caractère hydrophobe du pétrole, une Water Accommodated Fractions (WAF) est générée afin d'exposer les poissons à la fraction soluble de l'hydrocarbure. Cette fraction soluble est obtenue en mettant en contact pendant une durée de 24 heures une quantité précise de pétrole avec un volume d'eau de mer connu. Pendant ce laps de temps, les molécules hydrocarbonées les plus légères vont diffuser lentement de la nappe de pétrole en surface vers la colonne d'eau, et ainsi, la contaminer. Comme cette contamination est le résultat d'un équilibre entre la phase pétrole et la phase aqueuse, la concentration finale en pétrole dissous sera déterminée a posteriori par l'analyse d'échantillons en chromatographie en phase gazeuse (GC/MS). Cette WAF va correspondre à la solution mère, c'est-à-dire à la concentration d'exposition maximale, et les autres solutions d'exposition seront obtenues par des dilutions successives. Ce protocole suit la ligne directrice de l'OCDE n°203 adopté par la convention OSPAR.

In fine, les conditions opératoires sont :

- o Gamme de concentrations testées exprimées à l'aide de la quantité de pétrole utilisée pour préparer la WAF (0.6, 1.4, 3.2, 7.5, 17.2, 39.5 g/L).

- o 100 turbots répartis comme suit :

- o 6 bacs de 16 litres à 6 concentrations de WAF différentes * 10 poissons = 60 poissons

- o 2 bacs témoin de 16 litres * 10 poissons = 20 poissons

- o 2 bacs positif au toxique de référence (3,5-dichlorophenol à 1mg.L-1) de 16 litres * 10 poissons = 20 poissons.

Lors de la réalisation d'un test en toxicité aiguë, il est important de s'assurer de la sensibilité de la population exposée qui est susceptible de varier d'un essai à l'autre. Cette vérification se fait grâce à deux conditions contrôle : la condition témoin qui permet de vérifier que la population est dans un bon état physiologique et la condition toxique de référence qui permet de vérifier que la population est « normalement » sensible au polluant. Ainsi, le protocole OSPAR (page 20) précise que la CL50 est de 0,66 mg/L pour le 3,5-dichlorophénol, avec une marge autour de cette concentration moyenne. Ce test permet de valider l'étude, et ainsi, de comparer la toxicité de différents produits évalués selon cette procédure mais à des périodes différentes et par des laboratoires différents.

La règle des 3R (Réduire, Raffiner, Remplacer) est prise en compte dans la ligne directrice n°203 de l'OCDE. Le critère réduction est pris en compte, correspondant à un minimum de 7 poissons par bac et un maximum de 1 gramme de poisson par litre d'eau de mer. Par contre, le pourcentage maximum de perte dans les bacs témoin validant le test est de 10%, soit 1 poisson pour un bac contenant 10

poissons. Aussi, pour juger de la validité des contrôles, le nombre de poissons dans ces bacs ne peut être inférieur à 10, ce qui a été appliqué à l'ensemble des conditions de test. Le raffinement est pris en compte lors de la phase d'acclimatation avec la définition de valeurs limites pour les conditions environnementales dont notamment en oxygène dissous (>80%), pH (eau de mer), concentrations en nitrates et nitrites (<5 mg/L) et température de l'eau (15 °C). De plus, les poissons suivent le cycle jour – nuit naturel et ils sont nourris quotidiennement à satiété avec du Neo start coul 1 mixé. Un suivi visuel des poissons est prévu au moins 2 fois par jour pour contrôler leur bon état de santé, et l'absence de comportement anormal, une fiche suiveuse est mise en place à cet effet. En phase de test, les mêmes paramètres physico-chimiques de l'eau sont contrôlés, les poissons sont toujours soumis au cycle nycthéral et leur état de santé est contrôlé visuellement lors de deux passages quotidiens. Le remplacement n'est pas possible par la nature même du test. Il s'agit de déterminer une CL50, ce qui correspond à la concentration en polluant qui entraîne la mortalité de 50% de la population qui y est exposé. Ce projet nécessite donc l'utilisation de poissons vivants et le remplacement n'est pas envisageable.

7973 Les particules fines ($\leq 2.5 \mu\text{m}$) pénètrent profondément dans le poumon, atteignant les petites voies aériennes et les alvéoles pulmonaires. Ce phénomène est impliqué à la fois dans le rôle des polluants atmosphériques dans l'apparition des maladies pulmonaires chroniques telles que l'asthme et la bronchopathie chronique obstructive, et dans l'efficacité des traitements administrés sous forme d'aérosols ou de poudres inhalées. Nous savons que le transport de ces particules est gouverné par le flux de l'air dans les voies aériennes. Cependant, le flux gazeux dans les régions périphériques du poumon, c'est à dire au niveau des acini qui représentent des grappes d'alvéoles, dépend étroitement de la structure du tissu pulmonaire. Ce que nous savons sur le transport et la déposition des aérosols dans cette région du poumon provient essentiellement de modèles mathématiques et de simulations numériques. La limite actuelle de ces méthodes est qu'elles supposent des parois alvéolaires rigides, ce qui est radicalement différent de la réalité car nous savons que les structures tissulaires se déforment au cours de l'inspiration avec l'entrée de l'air dans le poumon, et que cette déformation est susceptible de modifier de manière importante la prédiction des modèles de déposition de microparticules. Il n'existe pour le moment, aucune donnée in vivo sur la déformation des structures tissulaires pulmonaires avec la respiration. A ce jour, l'estimation quantitative de la déformation structurelle du poumon au cours du cycle respiratoire provient d'études histologiques, et des mesures indirectes. Nous avons développé un modèle mathématique de prédiction de la déposition de microparticules qui est basé sur la comparaison de la concentration de ces particules dans l'air inspiré et expiré. Afin d'augmenter la précision de ce modèle et de le valider, il est nécessaire d'obtenir des données quantitatives sur la déformation des structures alvéolaires du poumon, et notamment la variation de leur volume, avec la respiration. L'objectif de ce projet : est de mettre au point une méthode d'imagerie haute résolution au rayons X, chez le rat in vivo, et de l'utiliser pour obtenir de données quantitatives sur le changement de volume et de conformation spatiale des acini pulmonaires, qui seront ensuite utilisées pour la validation de notre modèle de calcul. Une fois validé, notre modèle computationnel permettra de remplacer le modèle expérimental chez l'animal, et respectant le principe des 3R. La mise au point de la méthodologie et l'acquisition des données quantitatives nécessitera des expériences in vivo sur 2 groupes de 15 animaux, soit 30 rats anesthésiés et sous ventilation mécanique au total.

7974 Il y a environ 100 000 ans, des poissons téléostéens de rivière sont tombés accidentellement dans des grottes. Ils ont au cours de l'évolution perdu leurs yeux et leur pigmentation et sont devenus des poissons cavernicoles. Leurs congénères de surface n'ont pas disparu au cours de l'évolution et vivent toujours dans les rivières de surface. Ces deux populations de poissons, surface et cavernicole, appartiennent toujours à la même espèce ce qui nous permet d'utiliser une approche comparée de l'étude du système nerveux.

L'adaptation à la vie souterraine, en absence permanente de lumière a eu pour effet des changements dans le comportement des poissons cavernicoles (comparé aux poissons de surface) : la hiérarchie entre individus a disparue, ils ne nagent pas en banc, ils dorment moins, ils sont beaucoup moins agressifs que les poissons de surface, ils recherchent constamment de la nourriture, ils sont attirés par des vibrations à la surface de l'eau, ils explorent en permanence leur environnement et leurs

capacités chimio-sensorielles sont augmentées. C'est ce que l'on appelle le « syndrome comportemental » du poisson cavernicole.

Ainsi, ce projet vise à comprendre quelles sont les forces évolutives ainsi que la part de la plasticité neuronale impliquées dans l'adaptation comportementale d'animaux soumis à des changements d'environnement.

Pour ce projet, nous allons élever dans le noir des poissons de surface sur 10 générations. Nous testerons leur comportement à chaque nouvelle génération : test de locomotion, comportements sociaux, comportement olfactif et production de sons. Nous utiliserons au total 3200 poissons (dont 1600 qui seront élevés en condition de lumière normale et 1600 qui seront élevés dans le noir).

Les comportements développés au cours de l'évolution qui permettent à une espèce de s'adapter à son environnement sont complexes et non prévisibles. Le recours à l'utilisation d'animaux ne peut être remplacé. Cependant afin de réduire les nombres nous utiliserons des tests statistiques non paramétriques. De plus, afin de ne pas multiplier les groupes nous utiliserons les mêmes poissons pour effectuer l'ensemble des tests de comportements et produire la génération suivante par reproduction naturelle. Les conditions d'élevage des alevins et des adultes ont été particulièrement étudiées afin d'obtenir des poissons adultes en bonne santé, vifs et non stressés. Comme l'absence de lumière est permanente dès le stade œuf une cellule, nous estimons que le stress lié à l'absence de lumière est limité. Il correspond aux conditions rencontrées en milieu naturel par les populations cavernicoles d'*Astyanax* (et de toute la faune cavernicole). Nos tests de comportement consistent à filmer le comportement normal des poissons dans différentes conditions mais ils ne sont ni invasifs ni contraignants pour les animaux. Les poissons seront filmés avec une caméra infrarouge dans une pièce noire afin de ne pas stresser les animaux. Dans tous les cas, nous suivrons les signes de souffrance éventuels des animaux et procéderons si nécessaire à une interruption de l'expérience.

7975 L'infarctus du myocarde (IM) aigu demeure aujourd'hui une cause majeure de mortalité et morbidité dans le monde. Le conditionnement ischémique à distance (RIC) est une nouvelle stratégie thérapeutique qui consiste à induire de brèves séquences d'ischémie-reperfusion (I/R) au niveau d'un tissu ou d'un organe à distance du cœur. Il permet de réduire les lésions d'I/R dans l'IM aigu. Le RIC est un stimulus neuro-humoral qui induit une libération de facteurs circulants cytoprotecteurs qui induisent une protection à distance du cœur. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sont encore mal compris. Le RIC est associé à une augmentation de kynurénine plasmatique et la kynurénine est capable de reproduire l'effet protecteur du RIC. La voie de la kynurénine est une voie métabolique qui aboutit à la synthèse de nicotinamide dinucléotide (NAD), un cofacteur des sirtuines (déacétylases NAD-dépendantes). Les sirtuines étant connues pour jouer un rôle dans la cardioprotection contre les lésions d'I/R, nous nous interrogeons sur le rôle des sirtuines comme médiateur des effets bénéfiques du RIC et donc de la kynurénine.

Notre objectif est donc d'étudier l'implication des sirtuines dans la cardioprotection induite par le RIC. Nous étudierons, dans un modèle d'infarctus du myocarde, l'effet du RIC chez des souris contrôles et des souris KO pour SIRT3. Nous étudierons également chez ces souris l'effet de l'administration de kynurénine (150mg/Kg) sur la taille d'infarctus.

Cette étude sera réalisée chez la souris qui est un modèle de choix pour l'infarctus du myocarde aigu. Ce modèle est validé et est parfaitement maîtrisé au laboratoire. Nous étudierons l'effet du RIC sur la taille d'infarctus chez des souris KO pour SIRT3 (-/-) et leurs congénères contrôle (wild type +/-). Dans une seconde partie du projet, nous étudierons les voies de signalisation activées dans le cœur chez ces souris après ischémie-reperfusion myocardique avec ou sans RIC (par western blot). Enfin, une dernière partie examinera in vitro sur cardiomyocytes isolés de cœur de souris SIRT3 -/- et WT la viabilité cellulaire après hypoxie/réoxygénation. 174 souris au total seront utilisées pour ce projet. Le nombre d'animaux utilisés a été minutieusement établi de sorte qu'il y ait une utilisation optimale des animaux. Seules les expériences indispensables seront réalisées et il n'y aura pas de répétition inutile d'expérience. Nous utiliserons un anesthésique et un analgésique aux doses appropriées. De plus, il n'existe pas de méthode alternative, ni de modélisation possible de l'infarctus du myocarde aigu.

7976 Depuis quelques années, on découvre que les bactéries du tube digestif (le microbiote intestinal) jouent un rôle sur le comportement de l'hôte, ce qui a conduit à parler d'axe microbiote-intestin-cerveau. Par exemple, durant des tests d'anxiété ou des tests de mémoire, des rongeurs élevés sans bactéries dans un environnement stérile (animaux axéniques) exprimaient des comportements différents des rongeurs élevés normalement en présence de bactéries. Par ailleurs, les études réalisées chez l'Homme et les rongeurs montrent que le microbiote intestinal (MI) du jeune (microbiote intestinal initial) a une importance déterminante sur la composition du microbiote intestinal de l'adulte. Cependant, contrairement aux mammifères, les études sur le sujet manquent cruellement chez l'oiseau alors que l'amélioration du microbiote intestinal pourrait être une nouvelle voie d'amélioration de l'élevage des volailles.

Une précédente expérience nous a montré que l'absence de microbiote intestinal dès la naissance de la caille pouvait modifier ses comportements émotionnels.

Néanmoins, nous souhaitons conduire une nouvelle expérience qui nous permette, dans un premier temps, de valider les effets obtenus sur les comportements émotionnels puis, dans un second temps, de tester les effets de cette absence de MI sur les capacités de mémoire de la caille, ses réponses physiologiques au stress ainsi que sa neurogenèse (processus de création de nouveaux neurones) car une étude récente a fait rapport d'une neurogenèse augmentée chez des souris axéniques.

Comme dans la précédente expérience, nous allons utiliser une lignée de cailles sélectionnée pour sa forte réactivité émotionnelle pour former, dès la naissance, un lot de cailles dépourvues de MI (lot axénique) et un lot de cailles ayant reçu par voie orale un MI provenant du contenu caecal d'un donneur adulte de sa lignée (lot implanté).

Nous sexerons nos cailles à la naissance afin de n'utiliser que des femelles pour l'expérience et éviter des altercations violentes entre mâles une fois matures, comme il l'a été observé dans des expériences précédentes.

La prise en compte de la règle des 3R se décline par :

REMPACEMENT : Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Nous ferons éclore 210 cailleaux au départ afin de conserver 72 femelles pour l'expérience (3 isolateurs de 12 cailles pour le lot axénique et 3 isolateurs de 12 cailles pour le lot implanté). Nous utiliserons également 1 caille adulte comme donneur. Donc 211 animaux au total.

Avec cet effectif, étant donné la variabilité des paramètres comportementaux, nous pouvons mesurer les comportements émotionnels et espérer détecter une différence entre nos groupes.

RAFFINEMENT : Les animaux seront élevés en isolateur (afin d'éviter le développement d'autres bactéries que celles provenant du donneur) sur copeaux au départ. Un enrichissement sera apporté par l'apport lors de jours successifs d'objets nouveaux préalablement stérilisés et dissimulés dans l'isolateur. Les animaux resteront en groupe et seront visités deux fois par jour. Toute manifestation de symptômes persistants tels que définis dans les points limites engendra l'arrêt de l'expérience pour l'animal en question.

7977 La maladie d'Alzheimer (MA) représente un enjeu majeur pour notre société. La MA est un syndrome neurodégénératif associé à une perte progressive des fonctions cognitives. La MA est corrélée à des changements histologiques incluant des plaques amyloïdes, des dégénérescences neurofibrillaires et la mort neuronale qui conduisent inévitablement à la perte de mémoire et aux déficits dans la transmission synaptique.

Lors de la progression de la pathologie, les enregistrements de l'activité des neurones montrent des modifications comparativement à un sujet sain. En particulier, des études ont montré que l'accumulation de plaques amyloïdes pourrait jouer un rôle dans l'altération de l'activité synchrone des neurones appelée oscillations ou rythmes. Cette activité synchrone d'ensemble de neurones se produit à différentes fréquences et peut être mesurée par des techniques d'enregistrements électrophysiologiques.

Au cours de cette étude, nous allons nous intéresser aux rythmes corticaux et les mesurer par la technique électrocorticogramme (ECoG) chez des souris sauvages et chez deux modèles souris

transgéniques : les souris hAPP-Tg et les souris hAPPxPS1-Tg. Les modèles de souris transgéniques hAPP -Tg et hAPPxPS1-Tg que nous allons utiliser miment au mieux la MA puisque ces souris développent non seulement des plaques séniles et des dégénérescences neurofibrillaires mais aussi des déficits synaptiques et cognitifs et constituent donc un bon modèle pour l'évaluation de candidats thérapeutiques.

La première partie de cette étude nous permettra de mettre en évidence les modifications de l'ECOG chez les souris transgéniques et ainsi de déterminer quels sont les marqueurs électrophysiologiques de la pathologie. Dans une seconde partie, nous testerons l'efficacité de composés en développement sur ces modifications de l'ECOG.

Notre projet scientifique devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes impliqués dans la MA au niveau cortical et d'apporter des informations importantes pour le développement de stratégies thérapeutiques futures. Dans un second temps, la mise en évidence d'une signature électrophysiologique de la MA permettra de tester l'efficacité de composés en développement sur la MA.

Pour ce projet de 3 ans et dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement), 300 souris seront utilisées. Dans cette étude, des études électrophysiologiques sur coupes cérébrales seront menées en parallèle afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés. Cette étude in vivo, sur animaux vigiles, nous permettra l'enregistrement dans plusieurs structures en même temps et longitudinalement.

Une étude statistique prévisionnelle est prévue afin de déterminer la taille des lots nécessaire à l'obtention de résultats significatifs dans le but de réduire au minimum la quantité d'animaux utilisée dans ce projet. Dans un souci de raffinement, le bien-être des animaux sera attentivement suivi par l'établissement de fiches d'évaluations, permettant ainsi de minimiser toute souffrance, angoisse ou stress pour les animaux. Ces fiches permettront par ailleurs de déterminer des points limites précoces et adaptés.

7978 La sclérose en plaque est la première cause de troubles neurologiques d'origine non accidentelle du jeune adulte en Europe. Cette maladie touche plus de 80 000 personnes en France, dont plus de la moitié présentent des déficits neurologiques graves, qui perturbent lourdement leur vie et celle de leur proche de façon irréversible pendant des dizaines d'années.

La compréhension de la physiopathologie, le développement de méthodes de diagnostic par l'imagerie in vivo et la mise au point de thérapies adaptées pour la sclérose en plaque, sont étroitement liées à l'utilisation de modèles animaux. Ce projet vise à créer, caractériser et utiliser, un modèle récapitulant les caractéristiques principales des pathologies démyélinisantes pour le développement de nouvelles stratégies diagnostic et thérapeutique pour la clinique humaine. Pour cela, le choix d'une espèce de primate se justifie par le degré de parenté avec l'homme, sur un plan immunitaire, anatomique et fonctionnel. Une étude récente montre que l'espèce de Primate Non Humain retenue récapitule la diversité et la complexité des tableaux cliniques de cette pathologie chez l'homme.

Par ailleurs, une partie importante du projet est basée sur l'utilisation de cultures de cellules des animaux pour diagnostiquer, analyser les mécanismes physiopathologiques et mesurer les effets des thérapies testées. Ce choix diminue par trois environ le nombre d'animaux. De plus, au sein de chaque procédure, des analyses multiples sur les animaux (suivi au niveau cellulaire, développement, mise au point et validation de méthodes d'imagerie in vivo et de diagnostic, suivi clinique in vivo et post mortem, évaluation de stratégies thérapeutiques) permet de diviser par cinq le nombre d'animaux.

Pour autant, afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs, le projet nécessitera 96 à 114 animaux au maximum, mâles ou femelles (sexe indifférent) nés dans un élevage reconnu, âgés de 5 à 15 ans dans un premier temps, puis de moins d'un an dans une autre série, sur une durée de 5 ans. Le nombre d'animaux demandé prend en compte l'hétérogénéité interindividuelle du décours de la maladie.

La mise en œuvre de méthodes non invasives, le suivi quotidien des animaux et l'application de critères d'arrêt adaptés optimisent le bien-être des animaux. L'utilisation d'analgésique et

d'antalgique, après avis vétérinaire, permettra de réduire la durée et l'intensité des crises de la maladie pour ces travaux d'analyse longitudinale.

L'obtention d'un modèle animal mimant réellement la sclérose en plaque a pour but de comprendre la physiopathologie de la maladie, identifier de nouveaux biomarqueurs, mieux comprendre les éléments de l'imagerie diagnostique et enfin tester de façon pertinente, des stratégies thérapeutiques réellement applicables à l'homme.

7979 Nous avons développé un vaccin contre la peste, maladie infectieuse hautement mortelle pour l'homme, causée par la bactérie *Yersinia pestis*. Le vaccin est constitué par une *Yersinia pseudotuberculosis* vivante fortement atténuée par génie génétique, et il est très efficace chez la souris. Notre but est d'évaluer le risque de réaction fiévreuse lors d'une injection cutanée de ce vaccin, et cela ne peut pas être effectué autrement que chez l'animal car les causes en sont multiples et complexes. Nous utiliserons le lapin plutôt que la souris car sa sensibilité aux toxines bactériennes est proche de celle de l'homme. Le projet utilisera au maximum 24 lapins sur une période de deux ans, idéalement seulement 12 si l'expérience est directement convaincante. Le projet comporte une seule procédure de sévérité moyenne. Le nombre d'animaux a été soigneusement réduit au minimum. Les animaux seront suivis trois fois par jour afin de détecter rapidement tout signe de souffrance, et dans ce cas les points limites déterminés seront appliqués strictement. Parmi les phases de développement préclinique, la pharmacopée internationale prévoit une obligation de réaliser des tests exhaustifs de toxicologie. L'étude décrite ici est en amont par rapport à ces essais réglementaires mais elle permettra de tester le risque représenté par la vaccination cutanée à moindre coût animal et financier.

7980 Le devenir des plaquettes *in vivo* reste un sujet encore débattu. Il s'agit d'un problème central car il intervient dans l'efficacité des transfusions de plaquettes, ou dans les mécanismes pathophysiologiques de thrombocytopénies.

Cette clairance dépend en partie des macrophages, des cellules du système immunitaire qui ont la capacité d'internaliser du matériel extracellulaire. Il existe de nombreuses sous-populations de phagocytes distincts par leur localisation, leurs phénotypes et, leurs propriétés fonctionnelles au sein du tissu où elles résident. Nous proposons de développer des outils qui permettent de cibler spécifiquement des sous-populations particulières de macrophages afin de comprendre précisément leur rôle et leur importance lors de la clairance des plaquettes. Pour cela, nous utiliserons des réactifs plaquettaires qui, une fois internalisés par ces cellules, libèrent une toxine qui va conduire spécifiquement à la mort de ces cellules ciblées. L'intérêt d'une telle approche est double : identifier une sous-population cellulaire et évaluer son importance dans certaines réponses biologiques.

Une meilleure compréhension du rôle de ces cellules ouvrirait de nouvelles perspectives dans de nombreuses applications thérapeutiques.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Remplacer : Des tests de culture cellulaire *in vitro* seront réalisés en première intention pour mettre au point la concentration de réactifs nécessaire ainsi que le temps d'incubation requis pour entraîner une mort cellulaire. Les expériences *in vivo* sur souris seront réduites au minimum et tiendront compte des études *in vitro* pour diminuer le nombre d'animaux requis pour la mise au point de ce modèle.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure de papier pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les souris seront anesthésiées au début de l'expérience, c'est-à-dire au moment de l'injection du réactif. Pour éviter tout inconfort lié à l'injection dans le sinus rétro-orbitaire, une goutte de collyre anti-inflammatoire sera appliquée afin de diminuer au maximum la douleur qui pourrait être engendrée par l'injection elle-même. D'autre part, dès que le point limite est atteint les

animaux seront mis à mort afin de prélever les tissus. La procédure expérimentale sera arrêtée le plus précocement possible, dès que l'objectif de la procédure sera atteint.

Ce projet nécessitera 486 souris au maximum.

7981 La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) est la neuropathie démyélinisante la plus fréquente du système nerveux périphérique. Elle est associée à une altération des nerfs périphériques conduisant à une atrophie musculaire et une perte de sensibilité des membres. Sa prévalence est de 1/2500 et touche indifféremment les deux sexes. La forme CMT-1A est la plus fréquente (entre 70 et 80% des cas). Les gaines de myéline sont riches en lipides et en cholestérol mais également en protéines. La surexpression de la protéine PMP22 conduit à une neuropathie se déclenchant généralement avant 20 ans et entraînant des faiblesses musculaires distales puis au fur et à mesure une invalidation de la personne touchée.

Notre projet est d'introduire une nouvelle thérapie par nano médecine basée sur la restauration du niveau normal de PMP22 dont la surexpression est responsable de la maladie CMT-1A. Cette maladie ne bénéficie à l'heure actuelle d'aucun traitement curatif et les traitements actuels sont d'ordre palliatif.

Pour cela des souris transgéniques exprimant la pathologie seront étudiées pour leurs capacités locomotrices à l'âge adulte (8, 12 et 16 semaines) avant et après traitement par injection intraveineuse d'inhibiteur de la PMP22 et encapsulés dans des nanoparticules de squalène.

Nous analyserons la capacité des souris à explorer leur environnement, à se déplacer sur une barre horizontale. Nous mesurerons également la vitesse de conduction nerveuse au moyen d'électrodes placées sur le nerf sciatique. Cette procédure sera effectuée sous anesthésie générale pour éviter toute douleur. Nous mènerons ensuite des études biologiques ainsi que des études immunohistochimiques et histologiques des nerfs isolés.

Afin d'être en conformité avec les exigences des 3R pour minimiser le nombre d'animaux en expérimentation nous :

1) Effectuerons la preuve du concept qu'un traitement pourrait être conçu pour la maladie Charcot Marie Tooth :

- in vitro sur des cellules en culture pour choisir l'inhibiteur de PMP22 le plus efficace,
- in vivo sur des souris porteuses de la maladie Charcot Marie Tooth en leur faisant boire un antibiotique capable de diminuer le gène PMP22.

2) Injecterons aux souris, les nanoparticules squalène inhibitrices du gène PMP22 responsable de la maladie.

3) Prélèverons le maximum de tissus biologiques sur chaque animal après sacrifice.

4) Utiliserons des tests statistiques appropriés afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Nous allons également raffiner l'étude en évitant des tests comportementaux douloureux, en réduisant la durée de l'étude au maximum et en appliquant des points limites notamment la mise à mort des souris en cas de souffrance majeure.

Le nombre total d'animaux nécessaire pour cette étude est de 680 sur une durée de 5 ans.

Dans le cas où le phénotype de la pathologie est identique pour les deux fonds génétique B6 et CBA et qu'elles répondent d'une façon identique au traitement par antibiotique, le nombre de souris sera drastiquement réduit (365 au lieu de 680).

7982 Le choc cardiogénique est lié à une défaillance du cœur (principalement suite à un infarctus) entraînant des désordres de la circulation sanguine et par conséquent des problèmes métaboliques et viscéraux. C'est une pathologie fréquente dans les services de réanimation et malgré les progrès de la prise en charge, sa mortalité reste élevée (50 %). Pour le choc cardiogénique réfractaire traduisant un état de choc persistant malgré l'optimisation des thérapeutiques conventionnelles maximales, l'assistance circulatoire est proposée (ECMO : extracorporeal membrane oxygenation).

La mise en œuvre d'une ECMO au cours de la prise en charge de choc cardiogénique peut remplacer la fonction cardiaque, mettre au repos le cœur et ainsi de gagner du temps pour une récupération

vasculaire. Il maintient une perfusion tissulaire satisfaisante dans l'attente d'une récupération myocardique ou d'une transplantation.

Nous avons choisi d'étudier l'implication du débit d'ECMO à 2 niveaux différents : 70 et 35 ml/kg/min. Notre hypothèse principale est qu'un débit d'ECMO bas durant la phase précoce de réanimation pourrait réduire les conséquences de l'état de choc.

Nous proposons donc d'étudier ce phénomène sur un modèle porcin sous l'ECMO : sous anesthésie générale, le cochon sera placé en choc cardiogénique suite à un infarctus provoqué par l'occlusion d'une artère coronaire puis placé sous assistance circulatoire. Les animaux seront répartis en 2 groupes : un groupe d'animaux témoins + un groupe d'animaux auxquels le débit d'ECMO est abaissé à 35ml/kg/min. De nombreux paramètres physiologiques et biologiques seront étudiés afin d'établir ou non un impact positif de la variation du débit d'ECMO dans le traitement du choc cardiogénique. A la fin de la procédure, les animaux sont mis à mort afin d'effectuer une étude anatomo-pathologique sur les tissus.

Ce modèle animal est utilisé pour sa similitude avérée, en terme d'hémodynamique (circulation sanguine) et de morphologie cardiaque, avec les processus physiologiques rencontrés en clinique humaine. Il n'existe pas de méthodes alternatives permettant de s'affranchir du modèle animal (Remplacement).

Suite au projet en cours, 10 cochons mâles (poids = 50-60kg) supplémentaires sont nécessaires pour renforcer la puissance statistique.

Nous avons une bonne expérience de ce modèle dans notre structure et faisons appel à un chirurgien cardiaque qui opère dans les mêmes conditions qu'à l'hôpital. Cela nous permet de réduire le nombre d'animaux. Cependant, la mortalité, comme en clinique, reste élevée et nous devons ajouter à notre étude précédente quelques individus.

Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu), de soins (points limites) et surtout les méthodes utilisées (opérations sous anesthésie générale, analgésie contrôlée) qui sont des méthodes dérivées directement de la pratique clinique permettent un raffinement de la méthodologie. Nous avons également défini des points limites qui ne seront pas dépassés grâce aux procédures médicamenteuses disponibles au laboratoire (analgésie contrôlée, anesthésie chirurgicale).

7983 Le but de ce projet est de tester des inhibiteurs d'enzymes responsables du stress oxydatif, les NADPH oxydases (NOX) sur un modèle d'angiogenèse.

L'angiogenèse est un processus physiologique normal (développement embryonnaire, reconstruction vasculaire) ou pathologique (croissance des tumeurs, complications liées au diabète (rétinopathie)...). Une vascularisation trop importante et anarchique a alors des conséquences catastrophiques sur le fonctionnement et l'oxygénation des tissus touchés.

La littérature suggère un rôle déterminant du stress oxydant, notamment de NOX1, dans l'angiogenèse.

Nous avons identifié les molécules les plus prometteuses dans des modèles de migration et prolifération cellulaires. Nous aimerions les tester dans un organisme vivant complexe et développer un modèle in-vivo d'angiogenèse.

La compréhension de l'angiogenèse et de la perméabilité vasculaire est importante à la mise en place de thérapeutiques efficaces en cancérologie. Nous utiliserons deux procédures pour les quantifier séparément.

Procédure expérimentale 1 (angiogenèse) : le système DIVAA® permettra à des vaisseaux sanguins de se former depuis l'extérieur jusqu'à l'intérieur de bioréacteurs, placés sous la peau des animaux. La quantification d'un marquage fluorescent permettra d'analyser le développement des nouveaux vaisseaux.

Design :

-groupe contrôle (5 souris avec deux bioréacteurs)

-groupes Angiogenèse (5 souris avec deux bioréacteurs + facteurs de croissance pro-angiogéniques, traitées par gavage quotidien avec le véhicule ou 3 doses de nos composés (dose réponse).

A la première expérience, 5 souris seront traitées avec un anticorps murin anti-VEGF (DC101), référence pour valider le modèle et positionner nos composés.

Procédure expérimentale 2 (perméabilité vasculaire) : l'essai de Miles comporte une injection IV de bleu Evans pour marquer le réseau vasculaire. Une injection intradermique (ID) de facteur de croissance sera effectuée dans une zone pré marquée sur le dos de la souris. Après 1 heure, la peau de la zone d'injection sera prélevée et la perméabilité vasculaire quantifiée par absorbance.

Nous regarderons l'effet de nos inhibiteurs de NOX1 sur la croissance de nouveaux vaisseaux et sur la perméabilité vasculaire.

Design (8 animaux par groupe) :

-groupe contrôle (injections ID : 1 NaCl et 1 VEGF dans 2 zones différentes du dos de la souris)

-groupe traitement (injections ID : 1 NaCl et 1 VEGF + composé).

Chaque animal sera son propre contrôle, permettant ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés en gardant une puissance statistique forte.

Le test de Bonferonni déterminera les différences significatives entre les moyennes des groupes dans une analyse de variance (ANOVA).

Il est prévu de tester :

- PE1 : 15 molécules pour 380 souris

- PE2 : 5 molécules pour 80 souris.

Soit un total de 460 souris mâles C57Bl/6 pour les 2 procédures sur 2 années.

Lors de l'implantation des bioréacteurs, nous veillerons à respecter les conditions d'asepsie (lidocaïne) et les animaux recevront du paracétamol.

Une surveillance clinique sera réalisée lors du gavage des animaux.

Tout signe clinique notifiant une souffrance ou infection conduira à l'euthanasie.

Les animaux seront hébergés dans des conditions standards d'animalerie (5 souris par cage, alimentation et abreuvement à volonté). L'environnement sera enrichi par du coton pour nidifier et un dôme pour se cacher

7984 Les maladies inflammatoires cryptogénétiques de l'intestin (MICI) regroupent la maladie de Crohn (MC) et la rectocolite hémorragique (RCH) dont la physiopathologie est complexe et encore largement méconnue. Elles se caractérisent par une inflammation du tube digestif et se présentent sous forme de poussées aiguës inflammatoires entrecoupées de phase de rémission de la maladie. L'administration de médicaments anti-inflammatoires ou immunosuppresseurs (corticoïdes, cyclosporine, anticorps monoclonaux type infliximab...) permettent le plus souvent de juguler la phase aiguë et d'allonger les périodes de rémission. Plusieurs lignes de traitement sont parfois successivement utilisées afin d'obtenir la cicatrisation de la muqueuse intestinale. L'inflammation aiguë peut cependant se compliquer, et ce malgré les différentes thérapeutiques, par la nécrose tissulaire nécessitant la résection partielle ou totale du colon (colectomie) et impacte directement la qualité de vie des patients, le plus souvent jeunes et actifs.

Le cytomégalovirus (CMV) est un virus de la famille des Herpesviridae. Ce virus se transmet par les sécrétions (salive, lait, sperme, urines, etc.) et le virus va se multiplier dans de nombreux types cellulaires de l'organisme avec production de particules virales ; cette phase de primo-infection est en général asymptomatique chez le sujet immunocompétent. Chez le fœtus, il est responsable d'atteintes neurologiques aux conséquences variables (allant de la surdité à des séquelles sévères), voire la maladie des inclusions cytomégaliennes. Chez le patient immunodéprimé (greffe d'organe, greffe de cellules souches hématopoïétique, patients sous corticoïdes, immunosuppresseurs ou chimiothérapie, patients en réanimation, etc.), l'infection à CMV est facteur de morbidité (perte du greffon, aggravation de l'immunodépression, augmentation du risque infectieux) et de mortalité.

Nos travaux cliniques montrent que le cytomégalo virus (CMV) joue un rôle actif péjoratif dans les poussées de rectocolite hémorragique (RCH). Nous souhaitons étudier les interactions de CMV avec la muqueuse intestinale in vitro et dans un modèle de souris afin de mieux comprendre la physiopathologie de cette relation, et d'étudier des approches médicamenteuses curatives ou vaccinales pour limiter l'impact de cette infection chez des patients atteints de RCH souvent jeunes et actifs.

Le nombre de souris nécessaires à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale. Nous prévoyons d'utiliser au maximum 388 animaux sur une période de 5 ans. De l'analyse in vitro sera effectué au cours du projet, notamment pour la titration du virus. Mais ces analyses in vitro, bien qu'indispensables, ne sont pas suffisantes pour analyser les colites inflammatoires. L'utilisation de souris permet de se rapprocher de la situation clinique au cours de laquelle CMV est réactivé à partir du réservoir latent du colon lors de poussées inflammatoires de RCH chez les patients.

Chaque animal bénéficie d'une attention et de soins de qualité, par du personnel qualifié, pendant les interventions mais aussi en dehors de celles-ci afin d'assurer un bien-être optimal tout au long de l'étude. La douleur est rigoureusement contrôlée grâce à des points limites évalués en amont, et gérée grâce aux moyens pharmacologiques appropriés (myorelaxant / anesthésie/analgésie). Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux (par 2); dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux.

Aux doses utilisées, le CMV est asymptomatique pour les souris. Seul l'ajout de DSS dans l'eau de boisson aura pour effet de déclencher une colite inflammatoire.

7985 Dans le cancer du sein, les fibroblastes activés (CAF pour cancer-associated fibroblasts) correspondent à environ 80% des fibroblastes totaux de la tumeur et contribuent aux nombreuses caractéristiques du cancer (prolifération des cellules cancéreuses, invasion, évasion immunitaire et métastases). Les tumeurs contenant de nombreux CAF sont souvent cliniquement agressives, résistantes à la thérapie conventionnelle et associées à une mauvaise survie.

Nous avons constaté que les CAF favorisent l'évasion immunitaire de la tumeur, la protégeant de l'attaque tumorale par le système immunitaire des patients. Il s'agit d'une considération importante compte tenu des progrès des immunothérapies réalisées au cours des dernières années. Des données de la littérature suggèrent que les patients atteints de tumeurs riches en CAF ne répondent pas autant aux traitements. Le ciblage des CAF, associé à des thérapies conventionnelles ou à une immunothérapie, pourrait conduire à un bénéfice thérapeutique surtout aux patients atteints de tumeurs riches en CAF.

Nous supposons que le ciblage des CAF rendra la tumeur plus immunologiquement « visible »; La complexité du système immunitaire ne peut être modélisée in vitro et nécessite l'utilisation de modèles in vivo, qui prennent mieux en compte les interactions stroma/cellules immunitaires.

Nous proposons d'explorer une nouvelle cible thérapeutique en utilisant un modèle de souris transgénique qui développe des tumeurs du sein palpables, multifocales, hautement fibrotiques (riches en CAF) et métastasées dans le poumon, similaires à des cancers du sein humains. L'objectif de ce projet est d'étudier l'effet du ciblage des CAF en utilisant un inhibiteur de NADPH oxydase 4 (NOX4); Il est montré que cette molécule supprime efficacement l'activation des fibroblastes in vitro et il a déjà été utilisé dans une phase 2 d'essais cliniques comme anti fibrotique chez les patients souffrant de néphropathie diabétique. L'utilisation de cette molécule dans la thérapie du cancer n'a pas été envisagée, et des résultats positifs précliniques dans cette étude fourniraient une base solide pour soutenir un essai clinique chez les patients atteints de cancer.

Nous pouvons nous appuyer sur des expériences antérieures utilisant cet inhibiteur de NOX4 pour calculer le nombre d'animaux nécessaires pour obtenir des données significatives dans l'étude proposée. Le nombre d'animaux requis pour obtenir des données significatives est évalué à 20 pour la durée du projet. Des études antérieures sur des souris ont montré qu'il est bien toléré, même à des

doses plus élevées, sans effets indésirables. Pour mimer l'invasivité de la technique de gavage oral, les souris seront dosées une fois par jour pour éviter le stress.

Donner également un petit volume de médicament est mieux toléré par les animaux. Le véhicule a été optimisé afin que la dose souhaitée puisse être remise en suspension dans 10ml/kg pour éviter l'inconfort à l'animal lors de la réception du médicament.

Les animaux seront soigneusement surveillés et le développement et la croissance des tumeurs seront mesurés tout au long de l'étude. Les animaux seront observés et pesés pour s'assurer qu'ils montrent des signes de comportement et d'alimentation normaux. Les souris seront hébergées par 5 pour permettre l'interaction sociale et un environnement enrichi sera fourni.

7986 Dans un contexte de réchauffement climatique, nos travaux ont montré une amélioration de la capacité d'adaptation des poulets de chair à des environnements chauds par l'exposition des embryons à des augmentations cycliques de température pendant l'incubation des œufs. Cependant, les mécanismes de mémorisation de cette stimulation précoce restent à ce jour non compris. Nos études préliminaires montrent que des marques épigénétiques (des modifications chimiques transmissibles et réversibles entourant les gènes et modulant leur expression) sont très certainement impliquées. Notre objectif est de mettre en évidence les changements épigénétiques suite à une thermo-manipulation embryonnaire (TM) et de déterminer la part de ces modifications épigénétiques qui est transmise chez leurs descendants. En plus des connaissances fondamentales fortement attendues par la communauté scientifique, l'identification des mécanismes moléculaires induits par une exposition précoce à la chaleur chez l'oiseau devrait favoriser le développement de protocoles d'acclimatation adaptables à différentes conditions d'élevage. Dans ce projet, nous étudierons les modifications épigénétiques induites par un traitement de TM chez des cailles japonaises (39,5°C 12h/j des jours E0 à E13 de l'embryogenèse, le reste du temps à 37,8°C) en les comparant à des animaux incubés en condition témoin (37,8°C constant). La caille a été choisie car cette espèce modèle très proche du poulet présente l'avantage d'un temps de génération court. Par ailleurs, nous utiliserons une lignée de caille fortement consanguine dont nous connaissons la généalogie, les conditions d'élevage et qui présente une faible variabilité génétique permettant d'assurer la faisabilité de l'étude sur plusieurs générations. Dans ce projet, nous ferons éclore 4320 animaux dont 1600 auront subi une TM pendant l'incubation des œufs, sur quatre générations, aboutissant à la création de trois lignées : C (incubations standard à chaque génération), M (répétition du traitement TM à chaque génération), et T (deux générations non traitées faisant suite à deux générations traitées). Des prélèvements de sang seront réalisés sur 176 animaux TM et 264 témoins sur les 4 générations. Ainsi, 1864 animaux subiront au moins une procédure expérimentale sur l'ensemble du protocole.

Remplacement : La question biologique posée sur la nature de la réponse épigénétique d'un animal à la chaleur dans différents organes (dont foie et cerveau) nécessite l'utilisation d'animaux vivants et exclut la possibilité de réaliser ces expériences sur des lignées cellulaires.

Réduction : Le nombre d'animaux prélevés est nécessaire et suffisant pour échantillonner suffisamment de tissus et tirer des conclusions significatives selon notre expérience. Le nombre d'animaux mis en lignée est nécessaire pour assurer un brassage génétique non frère-sœur permettant de réduire les problèmes d'incompatibilités liés à la consanguinité.

Raffinement : Lors de l'incubation, l'hygrométrie sera augmentée afin de prévenir la perte d'eau par déshydratation dans l'incubateur. La TM induisant une mortalité post-embryonnaire identifiée dans le cadre du précédent projet, les animaux seront observés au moins deux fois par jours pendant les trois premières semaines d'âge. Tout animal atteignant le point limite défini au préalable sera sorti de l'expérimentation. Les animaux seront élevés en groupe au sol en conditions enrichies par la présence de copeaux et de congénères. La prise de sang sera réalisée au calme par manipulation douce des animaux par du personnel formé.

7987 La cigarette électronique (ou e-cig) est actuellement recommandée comme aide au sevrage tabagique. Pourtant, en l'absence d'études toxicologiques approfondies et de surveillance des consommateurs sur le long terme, l'innocuité de ce produit ne peut être garantie. En effet, certaines études rapportent la présence dans les vapeurs de faibles quantités de composés toxiques (aldéhydes, nitrosamines, métaux,...). Bien que ces substances aient été détectées pour la plupart à

des niveaux très inférieurs à ceux mesurés dans la fumée des cigarettes classiques, le vapotage régulier et prolongé pourrait présenter un risque pour la santé. Même si des approches in vitro ont permis d'évaluer les effets toxicologiques des vapeurs d'e-cig à court terme, il est maintenant nécessaire de développer un modèle murin afin d'étudier l'impact respiratoire à long terme de cette exposition et de la comparer aux effets provoqués par la fumée de cigarette. C'est ce que nous nous proposons de faire dans le cadre du projet financé par l'INCA (Institut National du Cancer). Ainsi des souris BALB/c seront exposées pendant 1 semaine, 3 mois ou 6 mois (5 jours/semaine) aux vapeurs issues de 2 modèles d'e-cig (faible et forte puissance), à la fumée de cigarette ou encore à de l'air ambiant (contrôle négatif). Une machine à fumer et un système « nose-only » (ou « nez seul ») permettant d'exposer 18 souris simultanément seront utilisés pour ces expériences.

Les objectifs de ce projet seront :

- Evaluer l'impact à long terme du vapotage sur la fonction respiratoire de la souris, l'inflammation, le stress oxydant, la fonction mitochondriale et le remodelage tissulaire.
- Etudier les effets génétiques (lésions primaires de l'ADN et mutations) et épigénétiques (modification des histones et méthylation de l'ADN) du vapotage.
- Identifier de nouveaux biomarqueurs (ARNm et microARN) d'exposition à l'e-cig et de ses effets grâce à des approches transcriptomiques et pangénomiques.
- Comparer l'ensemble des résultats obtenus entre les 2 modèles d'e-cig et la fumée de cigarette conventionnelle.

Au total, ce projet devrait apporter des réponses importantes aux questions fondamentales que l'on se pose sur la sécurité sanitaire du vapotage à long terme.

Ce projet expérimental répond aux exigences de la « règle des 3 R » (remplacement, réduction raffinement). Au total 514 souris BALB/c seront nécessaires pour atteindre nos différents objectifs. Cette utilisation permettra de maximiser les données obtenues à partir de chaque animal afin de limiter ou d'éviter l'utilisation subséquente d'animaux supplémentaires, et ce, sans pour autant compromettre le bien-être animal. Une attention particulière sera portée à l'apparition de signes d'angoisse et/ou de douleur chez les animaux : altérations provoquées par la situation expérimentale, modifications comportementales, indices physiologiques et signes de déficience respiratoire. Si nécessaire, des modifications des procédures seront prévues au cours des expérimentations afin de réduire la douleur et la détresse et d'améliorer le bien-être des animaux.

7988 Dès le début du XX^{ème} siècle, des expériences menées sur des rongeurs laissaient apparaître que la modulation de l'apport nutritionnel pourrait moduler la croissance tumorale au cours du cancer. Cependant, chez le patient cancéreux, la malnutrition et la perte de poids sont reconnues comme étant des facteurs impactant négativement le pronostic des patients. Dans ce cadre, la pratique clinique favorise des apports élevés en protéines afin de lutter au mieux contre la cachexie cancéreuse. Or, le niveau d'apport protéique influence directement le niveau d'activation des voies telles que mTOR et PI3K/Akt qui conditionnent directement la croissance tumorale. Or il n'existe pas de données dans la littérature décrivant l'impact du niveau d'apport protéique sur la croissance tumorale.

De plus, en pratique, peu de patients peuvent se nourrir spontanément et, pour lutter contre la cachexie cancéreuse, on pratique la mise en place d'une nutrition artificielle (entérale : directement dans l'estomac ou parentérale : directement par voie intraveineuse).

Le but de ce travail est d'évaluer l'influence du niveau d'apport protéique sur la croissance tumorale et sur le métabolisme protéique de l'hôte afin d'évaluer le rapport bénéfice/risque du niveau d'apport en protéines, dans un modèle murin de cancer et chimiothérapie. Pour cela, nous utiliserons un modèle murin de cancer du côlon bien validé (des rats femelles Fisher 344 de 11 semaines qui se verront implanter la tumeur « Ward colon ») associé à une chimiothérapie (CPT-11 et 5-FU). Dans la première partie de l'étude, les animaux recevront un régime hypo-, normo- ou hyper-protéique sous forme de croquettes. Dans la seconde et la dernière partie, les animaux, après avoir subi une gastrostomie ou la pose d'une voie intraveineuse, seront placés sous nutrition artificielle (entérale ou parentérale) avec des apports croissants en protéines.

Dans cette étude, la croissance tumorale (taille des tumeurs, synthèse protéique tumorale) sera étudiée et nous explorerons le statut nutritionnel de l'hôte (protéolyse et synthèse protéique musculaire, force musculaire...).

Les conclusions de cette étude pourraient permettre d'optimiser les apports protéiques apportés au patient cancéreux sous chimiothérapie, quel que soit le type de nutrition donnée.

Le protocole a été établi pour satisfaire au mieux la règle des 3R :

Remplacer : Les études métaboliques évaluant une prise en charge nutritionnelle ne peuvent être réalisées ni in vitro ni ex vivo, ce qui nécessite l'utilisation de ce modèle murin.

Raffiner : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des procédures afin d'intervenir de manière rapide et appropriée au moindre signe clinique de douleur. De même des points limites seront établis afin de prendre en compte d'éventuels effets inattendus.

Réduire : Au vu d'études précédentes et dans le but d'obtenir une puissance statistique suffisante nous permettant de répondre de manière pertinente aux questions posées par l'étude, un effectif de 14 animaux par groupe est nécessaire compte tenu de l'hétérogénéité de la croissance tumorale, soit un total de 356 animaux pour l'ensemble du projet.

7989 L'hypertension artérielle est un facteur de risque cardiovasculaire qui affecte entre 10 et 40% de la population en fonction de l'âge. L'hyperaldostéronisme primaire est la forme la plus commune d'hypertension artérielle. L'une des principales causes de cette pathologie est la formation d'adénome produisant de l'aldostérone, hormone impliquée dans le contrôle de la pression artérielle. Ces dernières années, différentes mutations ont été identifiées comme responsables de la production autonome d'hormone dans ces tumeurs. Actuellement les mécanismes de formation de ces adénomes restent inexplicables.

L'accès à une grande cohorte de patients nous a permis d'élaborer une stratégie afin d'identifier des gènes impliqués dans le développement de ces adénomes. Des études réalisées in vitro nous ont permis de confirmer le rôle d'un certain nombre de ces gènes dans la régulation des phénomènes prolifératifs et/ou de régulation hormonale.

L'utilisation de modèles animaux est maintenant indispensable afin d'étudier de façon plus précise ces mécanismes et de reproduire le microenvironnement favorisant la multiplication anormale de cellules conduisant à la formation d'une tumeur. Il est en effet très difficile, voire impossible, de reproduire, par des expériences in vitro, tous ces mécanismes et interactions.

Nous étudierons le phénotype de trois lignées différentes de souris génétiquement modifiées.

En premier lieu, nous étudierons les effets d'une modification de l'apport sodé (régime riche ou pauvre en sel) sur les fonctions rénales et cardiaques d'animaux adultes en réalisant des prélèvements sanguins et urinaires et en mesurant la pression artérielle chez des souris âgées de 12 à 52 semaines.

Nos études portant sur les mécanismes de formation d'adénome, un mécanisme qui met du temps à se mettre en place, il est nécessaire de pouvoir suivre les animaux sur des périodes relativement longues.

Nous suivrons le développement de la surrénale de ces souris par imagerie par résonance magnétique (IRM) à 6 mois puis tous les 3 mois jusqu'à l'âge de 18 mois.

Un groupe de souris subira une mesure de la pression artérielle par télémétrie, ce qui nécessite une intervention chirurgicale qui sera réalisée sous anesthésie générale. De plus, des antalgiques et des antibiotiques seront administrés afin de soulager la douleur et d'éviter d'éventuelles infections post-opératoires.

Le nombre de souris utilisées dans le cadre de ce projet est de 1024.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisés sera réduit à son minimum. Les souris seront suivies sur une période pouvant aller jusqu'à 18 mois, et seront soumises à différentes procédures. Une période de récupération sera prévue entre chaque séquence de procédure. Lors des procédures une surveillance journalière sera mise en place afin de réduire au maximum la souffrance

et l'angoisse des animaux. Enfin pour chaque procédure des points limites ont été établis, entraînant l'exclusion de l'animal du protocole et sa mise à mort anticipée.

Les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des adénomes produisant de l'aldostérone. A terme, ces résultats pourraient permettre le développement de nouveaux traitements ciblant les voies mises en cause et représenter une alternative aux options actuellement disponibles.

7990 Contexte : Le sepsis est défini comme une infection de l'organisme par un agent pathogène, qui conduit à une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital. En s'aggravant, le sepsis peut conduire au choc septique, stade le plus grave de l'infection, qui est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes du sepsis et du choc septique, afin de trouver de nouveaux traitements.

Une des principales caractéristiques du sepsis est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. On sait par exemple que les globules blancs, en particulier les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire. Par contre, on connaît beaucoup moins bien le rôle joué par les plaquettes sanguines. Celles-ci sont bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, en s'accumulant au site de lésion vasculaire pour former un agrégat qui arrête les saignements. Dans le sepsis et le choc septique, des résultats récents indiquent que les plaquettes pourraient avoir des effets délétères par l'exacerbation de l'inflammation mais aussi des effets bénéfiques par leurs propriétés anti-infectieuses. La glycoprotéine VI (GPVI), présente à la surface des plaquettes, est le récepteur du collagène de la paroi vasculaire, et joue un rôle central dans l'activation des plaquettes.

Objectifs : Ce projet vise à mieux comprendre le rôle de la GPVI des plaquettes dans le sepsis et le choc septique afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour des traitements plus efficaces. Il sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- des traitements antalgiques seront administrés ;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ;
- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 92 souris.

7991 Contexte : Avec 8.8 millions de décès en 2015 (OMS 2017) le cancer est la 2^e cause de mortalité dans le monde. Malgré une amélioration de la prévention et de la prise en charge thérapeutique du cancer primaire, la formation de métastases reste la principale cause de mortalité due au cancer. Les métastases sont des cancers secondaires se formant dans d'autres organes que celui où s'est développée la tumeur primaire. Le processus métastatique est complexe et comprend une succession d'étapes. Tout d'abord des cellules tumorales se détachent de la tumeur primaire (évasion), envahissent le tissu environnant (invasion), puis passent dans la circulation sanguine ou lymphatique. Certaines de ces cellules tumorales sont capables de quitter la circulation et d'atteindre un nouvel organe où elles développeront une tumeur secondaire. Selon la tumeur primaire, les métastases se développent préférentiellement dans certains organes comme les poumons, le foie, la moelle

osseuse. Toutes ces étapes dépendent de caractéristiques spécifiques des cellules tumorales, telles que la surexpression ou la sous-expression de certaines protéines. Le microenvironnement de l'organe hôte, i.e. la présence de différents types cellulaires et de protéines extracellulaires, joue aussi un rôle clé dans le développement de la métastase.

Pour un même cancer, certaines tumeurs primaires sont plus agressives que d'autres, c'est-à-dire qu'elles ont une très forte probabilité de former des métastases et nécessitent une chimiothérapie plus forte et donc plus toxique pour le patient. Actuellement il n'existe aucun biomarqueur susceptible de prédire l'évolution métastatique d'une tumeur primaire. Or cela permettrait d'adapter d'emblée la thérapeutique aux patients à haut risque métastatique.

L'objectif de cette étude est d'évaluer la capacité métastatique d'une lignée de cellules cancéreuses humaines dans lesquelles nous avons modifié l'expression d'une protéine pour déterminer si cette dernière serait un marqueur de risque métastatique chez le patient.

Pour cela nous injecterons à des souris ces cellules tumorales dans la circulation sanguine et rechercherons l'apparition de métastases pulmonaires. Nous utiliserons un total de 113 souris, dont 36 au maximum pour une étude pilote.

Remplacer

Nos tests réalisés *in vitro* montrent que la protéine ciblée par l'étude est impliquée dans des processus cellulaires métastatiques comme l'évasion ou l'invasion. Afin de valider le rôle de cette cible dans le développement de métastases, nous devons utiliser des souris car il n'existe pas de modèles *in vitro* reflétant la complexité du processus métastatique (succession d'étapes, rôle du microenvironnement).

Réduire

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en permettant un test statistique d'analyse de variance ANOVA. L'étude pilote permettra d'optimiser les conditions expérimentales afin de réduire le nombre de souris utilisées par la suite. Elle permettra également de renoncer à l'étude complète si elle ne donne aucun résultat positif. Le nombre d'animaux utilisés dans ce travail a pu être réduit au maximum car nos travaux préliminaires réalisés en collaboration avec des cliniciens sur une cohorte de patients montrent qu'il existe un lien entre la protéine ciblée dans l'étude et l'apparition de métastases chez le patient.

Raffiner

Pendant les procédures, les conditions d'hébergement sont adaptées à l'état des animaux et les soins nécessaires sont appliqués. Une fois traités, les animaux retournent dans leur cage d'origine avec leurs congénères afin de conserver leur environnement (cage adaptée au nombre de souris, coton compressé et frisure de papier kraft pour la constitution des nids, accès permanent à l'eau et à la nourriture). Les animaux utilisés pour les expériences sont observés quotidiennement et le score du point limite évalué après les injections et deux fois par semaine pendant la durée de l'expérience (poids, état général de l'animal, comportement). Les métastases pulmonaires peuvent gêner la respiration de l'animal ; nous porterons donc une attention particulière à la qualité de cette dernière.

7992 Les glioblastomes (GBM) sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'adulte. Leur pronostic reste sombre en raison de récurrences très agressives survenant au décours d'un traitement associant radiothérapie et chimiothérapie. La présence d'une sous population de cellules à caractère « souche » (GSC : glioblastoma stem-like cells), résistantes au traitement est évoquée pour expliquer en partie ces récurrences.

Par ailleurs, les GBM sont caractérisés par une importante vascularisation. La mise en place de vaisseaux associés à la tumeur apparaît précocement lors de la progression tumorale. Cette vascularisation bien qu'abondante, est morphologiquement et fonctionnellement anormale, favorisant l'installation d'une hypoxie au sein de la tumeur aidant au maintien du caractère souche des GSC. Ces dernières sont le plus souvent retrouvées à proximité des vaisseaux au sein de niches formées par les cellules endothéliales, ce qui suggère fortement que les cellules endothéliales et les GSC établissent des contacts importants pour le maintien des caractéristiques souches des GSC. Différents mécanismes de mise en place de cette vascularisation anormale ont été décrits. Il a notamment été montré que des cellules avec des caractéristiques endothéliales (cellules

« endothéliales-like » dérivées de tumeurs ou TDEC (tumor derived endothelial cells)) provenaient de la transdifférenciation de GSC. Compte tenu de l'importance de la vascularisation au sein des GBM et pour le maintien des GSC, la capacité de ces dernières à réaliser une transition glio-endothéliale pourrait alors participer à la récurrence des GBM après traitement, notamment après radiothérapie. En effet, nos résultats *in vitro* montrent que les TDEC obtenues à partir de GSC irradiées ont des capacités fonctionnelles endothéliales augmentées par rapport aux TDEC obtenues à partir des GSC non irradiées.

Identifier les voies moléculaires régissant ce mécanisme de transdifférenciation radio-induite permettra de synthétiser des inhibiteurs de ces voies utilisables en clinique humaine pour accroître l'efficacité des thérapies.

Nous avons identifié *in vitro* des protéines impliquées dans cette transdifférenciation radio-induite. Toutefois, dans les tumeurs des patients les cellules comme les TDEC se développent dans un microenvironnement contenant d'autres types cellulaires, des facteurs de croissance. Au contact desquels elles se modifient, s'adaptent, diffusent. Il est donc indispensable de valider notre preuve de concept dans ce contexte plus global qu'il est impossible de reproduire *in vitro*.

Nous envisageons donc d'utiliser un modèle murin très largement utilisé pour valider *in vivo* les études *in vitro*, le modèle de souris immunodéficientes ou « nude » dans lequel seront injectées en sous-cutanée les cellules tumorales présentant une inactivation des voies d'intérêt mixées à une matrice extracellulaire (Matrigel). Après 15 jours, nous nous attendons à observer une diminution de la formation de nouveaux vaisseaux dans le Matrigel plug contenant les TDEC dans lesquelles les voies d'intérêt ont été inhibées.

Dans un premier temps nous devons mettre au point ce modèle avec nos cellules TDEC, ce qui nécessitera environ 45 souris.

Sur la base de nos études antérieures et des données de la littérature, nous avons limité le nombre d'animaux à 8 par groupe de traitement. 5 animaux par groupe est le minimum requis pour avoir une significativité statistique. L'hétérogénéité tumorale, l'efficacité de la transdifférenciation qui peut être variable et la réponse à l'irradiation nous obligent à prévoir un nombre plus important d'animaux au départ. Le fait de prévoir des animaux supplémentaires nous épargnera de renouveler plusieurs fois les mêmes expériences. Quatre groupes seront nécessaires pour valider chacune des cibles préalablement identifiées *in vitro* : groupe TDEC provenant de GSC non irradiées, groupe TDEC provenant de GSC irradiées, groupe TDEC provenant de GSC non irradiées et inhibition de la cible et groupe TDEC provenant de GSC irradiées et inhibition de la cible.

Nous envisageons de valider plusieurs cibles mais aussi d'étudier différents inhibiteurs spécifiques des cibles identifiées. Au total au cours de ce projet, nous utiliserons un maximum de 850 animaux.

Les animaux sont hébergés dans des conditions qui répondent à la fois à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. De plus, une personne est spécifiquement dédiée au bien-être des animaux. Afin de réduire au maximum le stress des animaux, ils seront manipulés avec précautions et calme durant toute la durée de l'expérience. Les animaux seront observés tous les 2 jours afin de repérer précocement les signes de souffrance. Les animaux seront mis à mort après avoir récupéré le plug, soit 15 jours après l'injection sous-cutanée. Toutes les manipulations qui pourront être stressantes ou douloureuses pour l'animal seront réalisées après anesthésie (injection sous-cutanée, récupération des plugs).

Ce projet applique la règle des 3Rs :

- le nombre d'animaux qui sera utilisé dans ce projet a été calculé au plus juste sur la base des données de la littérature et de nos études antérieures
- les animaux seront hébergés dans un environnement qui répond à la réglementation nationale et aux directives européennes dans le domaine de l'expérimentation et de l'éthique animale. De plus, toutes les manipulations qui pourraient être douloureuses ou stressantes pour l'animal seront systématiquement réalisées sous anesthésie.
- Notre travail repose beaucoup sur des données obtenues *in vitro*. Toutefois, les cellules tumorales évoluent dans un microenvironnement contenant d'autres types cellulaires et des facteurs de croissance qui sont impossible de reproduire *in vitro*. Afin de pouvoir valider nos résultats, nous

devons réaliser ces expériences dans un milieu in vivo (donc chez la souris) afin de se rapprocher le plus possible de l'environnement réel de la tumeur.

7993 Les parasites *Leishmania* sont transmis à l'hôte mammifère par la piqûre d'un insecte vecteur et sont responsables de maladies parasitaires cutanées, muco-cutanées ou viscérales, cette pathologie dépendant de l'espèce en cause. Ainsi les *Leishmania* (*L.*) *major* et *L.amazonensis* sont responsables de formes cutanées tandis que l'espèce *L. donovani* provoque une pathologie viscérale, mortelle en absence de traitement. Il n'existe à ce jour aucun vaccin et outre leur toxicité, les médicaments disponibles sont de moins en moins efficaces en raison notamment de l'apparition de parasites résistants vis-à-vis de ces traitements. Le développement de nouvelles thérapies préventives ou curatives dépend de la compréhension de la biologie de ces parasites complexes.

Les *Leishmania* se développent dans l'insecte sous une forme longue et flagellée appelée « promastigote ». Lorsque ces derniers sont transmis par piqûre aux hôtes mammifères ils sont capturés par des cellules du système immunitaire au sein desquelles ils se transforment en « amastigotes » caractérisés par une forme ronde dépourvue de flagelle. La multiplication des amastigotes à l'intérieur des cellules provoque à terme la maladie. Celle-ci est limitée à des lésions cutanées pour les espèces *L.major* et *L.amazonensis* alors qu'elle se manifestera par une augmentation de la taille de la rate et du foie, organes cibles, où l'espèce *L.donovani* va se multiplier.

A ce jour la forme promastigote peut être propagée en culture, néanmoins des études en laboratoire ont montré que les parasites ainsi maintenus perdent au fil du temps certaines de leurs caractéristiques dont leur virulence. La transformation du stade promastigote à celui d'amastigote repose sur un mécanisme très complexe qu'il est difficile voire encore impossible de mimer en culture notamment pour les espèces *L.major* et *L.amazonensis*. La seule espèce pour laquelle il est possible d'obtenir en condition axénique des amastigotes est *L.donovani*. Cependant des études récentes ont montré que celles-ci ont également, entre autres, une virulence atténuée. Dans ce contexte, l'étude des mécanismes biologiques des *Leishmania* et la recherche de nouvelles molécules antiparasitaires reposent sur l'accès à des parasites ex-vivo et donc à des modèles expérimentaux adaptés permettant la production en nombre de ces parasites.

En laboratoire, les rongeurs sont des hôtes permissifs au développement parasitaire qui diffèrent selon l'espèce de *Leishmania*. Ainsi, l'étude des leishmanioses cutanées peut être réalisée sur des souris alors que l'étude de la leishmaniose viscérale repose sur l'utilisation du hamster doré.

En ayant recours à un nombre limité de rongeurs femelles de laboratoire – 140 souris et 120 hamsters dorés, sur une période de 5 ans, deux objectifs essentiels de ce projet pourront être atteints : (1) étude des mécanismes associés à la virulence de ces trois espèces, au sein du genre *Leishmania* et (2) recherche de nouvelles molécules antiparasitaires.

L'inoculation en sous cutanée de *L. major* ou *L. amazonensis* conduit à la formation, au site d'injection, d'une lésion source de parasites virulents en grand nombre. Les souris femelles inoculées seront sacrifiées pour prélèvement de la lésion avant que celle-ci n'atteigne la classe sévère c'est à dire lorsque le volume de la lésion est inférieur ou égal à 1 cm³.

Pour les hamsters dorés femelles auxquels seront inoculés *L. donovani*, il ne sera pas possible d'éviter la classe sévère. En effet, la préparation de parasites ne peut être réalisée qu'à partir d'organes (foie et rates) fortement parasités ce qui implique un stade avancé de la maladie. Cependant tout sera mis en œuvre pour que la durée des processus graves soit la plus brève possible par un suivi individuel et hebdomadaire de la mesure du poids associé à l'observation des animaux. Avant de prélever les tissus, sources de parasites tous les rongeurs de laboratoire seront euthanasiés selon les procédures approuvées.

Afin de minimiser le nombre d'animaux et ainsi d'utiliser le mieux possible chaque animal, ces expériences sont le plus souvent couplées à des tests d'analyse in vitro de signatures immunes ainsi que la mise au point de protocoles de mesure de charge parasitaire.

nous utiliserons un anesthésique approprié pour éviter que les animaux ne souffrent.

Nous observons quotidiennement les animaux, s'il y a un signe de souffrance ils seront mis à mort.

7994 L'île de Taiwan a perdu son statut indemne de rage en juillet 2013 après 52 ans sans cas autochtone. La rage sévit actuellement chez un petit mustélide, le mélogale dans les 2/3 sud de l'île. Ce mélogale est à la fois réservoir et vecteur du virus qui lui est adapté.

La surveillance de la rage mise en place dans le pays entre 2010 et 2014 compris, a concerné 2197 animaux sauvages dont 506 chauves-souris et 9474 animaux domestiques. Quatre cent vingt-six cas de rage ont été diagnostiqués au total, chez 4 espèces : le mélogale (423cas/1074 analysés); la civette palmiste à masque (1/215); la grande pachyure (1/169) et le chien (1/9342).

Une surveillance spécifique a été mise en place en 2013, en complément de celle instituée en 1999 sur la rage canine, Taïwan étant entourée de pays où la rage du chien est endémique. Cette surveillance a montré que les contacts entre les mélogales et les chiens sont possibles surtout lorsque les mélogales sont enrégés. Il existe alors un risque pour la santé humaine qu'un chien non vacciné (malgré la politique de vaccination obligatoire des chiens en zone infectée) contaminé par un mélogale infecte ses propriétaires.

La surveillance sur le terrain semblant efficace, l'explication de la faible importance des cas chez le chien (0.2% des cas diagnostiqués) peut être la faible sensibilité du chien à ce virus ou le fait que la politique de vaccination des chiens à Taïwan est très suivie. En effet, dans une situation comparable avec la rage du renard en France, entre 1977 et 2016, 13964 cas ont été diagnostiqués toutes espèces confondues (en excluant les 87 cas liés à la rage des chiroptères), avec 11068 renards (79.3%) et 222 chiens (1.6%).

Le projet se déroulera en deux étapes et utilisera au maximum 24 chiens. Après avoir validé l'activité létale du virus avec 2 groupes de 2 chiens, selon les résultats obtenus, 4 ou 5 doses différentes de virus seront injectées dans le muscle à des groupes de 4 chiens, effectif minimal permettant de compenser les variations individuelles. Le suivi des animaux comprendra un examen clinique, la cinétique de l'excrétion salivaire et de la sérologie. Lors de l'autopsie, le virus sera recherché dans différents prélèvements du système nerveux et des glandes salivaires, la diversité génétique des variants obtenus sera comparée à la souche inoculée qui servira de référence.

Ce type d'expérimentation ne peut pas actuellement être conduit in vitro. A partir du moment où les animaux présentent des signes nerveux évocateurs d'une atteinte du système nerveux central, ils seront médicalisés ou mis à mort selon l'avis du vétérinaire responsable de la cellule bien-être animal.

7995 Une inflammation est une réaction de défense immunitaire du corps à une agression externe comme une infection, un trauma, une brûlure ou une allergie. Il s'agit d'un processus complexe faisant intervenir principalement les globules blancs. Cependant, les plaquettes sanguines, dont le rôle est avant tout d'assurer l'arrêt du saignement en cas de rupture d'un vaisseau, pourraient également jouer un rôle dans la réaction inflammatoire. En effet, des travaux récents, menés chez la souris, suggèrent que les plaquettes sanguines auraient un rôle prépondérant et bénéfique dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation. Ce rôle serait dû à deux récepteurs présents sur les plaquettes, à savoir les protéines GPVI et CLEC-2. Parmi les médiateurs de l'inflammation, il est connu que les nucléotides extracellulaires jouent un rôle central, en activant les globules blancs. Ils sont également des activateurs des plaquettes sanguines, via leur liaison à des récepteurs spécifiques. Nous souhaitons évaluer la contribution potentielle d'un de ces récepteurs aux nucléotides, le récepteur P2X1 des plaquettes sanguines, dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation. Les mécanismes cellulaires participant au développement de l'inflammation sont complexes, aussi leur compréhension requiert des explorations expérimentales complémentaires in vitro et, in vivo dans des modèles animaux. Ainsi, le rôle des plaquettes dans le maintien de l'intégrité vasculaire lors d'une inflammation, a été mis en évidence chez la souris, à l'aide d'un modèle expérimental d'inflammation pulmonaire induit par les lipopolysaccharides (LPS) extraits de la paroi des bactéries. Nous étudierons le rôle du récepteur P2X1 dans cette réaction inflammatoire pulmonaire, à l'aide de souris déficientes pour le récepteur P2X1. Cette étude permettra de mieux comprendre le rôle de ce récepteur dans le maintien de l'intégrité vasculaire en conditions inflammatoires. Réduire : Le nombre d'animaux utilisé lors de cette étude est réduit au minimum afin d'obtenir des données statistiquement significatives, ce nombre étant fixé à 6 souris/groupe pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs par l'utilisation de test statistique one-way ou two-

way ANOVA, selon les questions posées et les expériences. Cette étude nécessitera l'utilisation de 206 souris.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ; les animaux sont hébergés dans des cages (3 souris/cage) individuellement ventilées contenant un nid en coton compressé et de la frisure de papier Krafft afin de leur permettre d'exprimer leur comportement de nidification naturel et de d'organiser leur environnement.
- les expériences sur animaux vigile auront une durée limitée dans le temps ;
- Pendant toutes les expérimentations, les animaux sont surveillés par du personnel expérimenté.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

7996 Les migraines constituent un problème de santé publique ayant un impact négatif majeur dans la vie quotidienne des patients. Les crises de migraine qui concernent 20% des femmes pour 6% d'hommes, sont caractérisées par des céphalées d'intensité modérée ou sévère, unilatérales, pulsatiles, pouvant durer entre 4 et 72 heures en l'absence de traitement. Ces céphalées sont associées à des modifications de la perception sensorielle telles que l'allodynie (douleur provoquée par une stimulation non douloureuse), la phonophobie et/ou la photophobie. Dans ce projet, nous nous intéresserons à l'apparition de la phonophobie lors des crises de migraine. L'audition peut être mesurée en utilisant des méthodes objectives, basées sur l'enregistrement de l'activité électrique de divers relais de la voie auditive. Les cellules ciliées de l'apex de la cochlée codent les basses fréquences et celles de la base codent les hautes fréquences. C'est pourquoi nous procéderons à l'enregistrement des otoémissions acoustiques. Cet enregistrement constitue une méthode d'évaluation des propriétés électromotiles des cellules ciliées en utilisant plusieurs fréquences différentes comme stimulation.

Pour réaliser cette étude, nous avons mis au point un modèle animal chez le rat qui consiste à injecter de manière répétée de substances inflammatoires (SI) à la surface des méninges et qui rend compte des différents symptômes observés lors des crises migraineuses. Nous effectuerons ensuite une analyse de l'effet de ces injections répétées -1 injection vs 4 injections (SI, 1x tous les 2 jours pendant 8 jours) comparées à celles de fluide cérébro-spinal artificiel (aCSF, témoin). Nous aurons 3 groupes d'animaux comprenant chacun 10 animaux : 1 groupe 1injection de SI, 1 groupe 4 injections de SI et 1 groupe aCSF.

Pour respecter la règle des 3R, Il est nécessaire de réaliser ces études in vivo car l'intégration de la douleur et du son implique de nombreuses régions du système nerveux central et périphérique (fibres). Il est donc nécessaire de réaliser les observations chez l'animal. Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au maximum. Dans ce but, les animaux auront une période d'habituation à l'expérimentateur et aux tests avant de débiter l'étude comportementale. Cette période d'habituation permet de réduire le stress des animaux lors des tests comportementaux et ainsi de réduire le nombre d'animaux chez qui il serait impossible de réaliser ces tests. Ce nombre tient également compte des animaux qui ne répondraient pas aux tests ou qui présenteraient des pertes d'audition dues à la présence d'otite, mais reste suffisant pour détecter un effet significatif entre traitements (analyse de variance et tests post hoc paramétriques ou non). Au total 30 rats seront utilisés dans ce projet. Pour évaluer l'audition, nous réalisons les tests fonctionnels sur l'animal anesthésié. Ils seront mis à mort à la fin des procédures par overdose d'anesthésique.

Avoir un modèle qui se rapproche le plus possible des conditions cliniques permettra par la suite de tester des substances pharmacologiques pour améliorer les traitements proposés aux patients migraineux.

7997 Le laboratoire a pour thématique principale d'étudier le rôle des cytokines dans le développement de pathologies inflammatoires chroniques de la peau telles que le psoriasis et la dermatite atopique. La description des activités de ces cytokines pro inflammatoires, qui agissent la plupart du temps en

synergie dans l'organisme sous la forme d'un réseau cytokinique, permet d'identifier celles qui jouent un rôle prépondérant dans la physiopathologie de ces maladies ; chaque pathologie se caractérisant par des profils particuliers d'expression cytokinique. Ces cytokines peuvent alors être la cible de nouvelles stratégies de biothérapie visant à bloquer leurs effets délétères par le biais d'anticorps neutralisants. Parmi ces cytokines, les interleukines 17 et 22 (IL-17 et IL-22) ainsi que l'oncostatine M (OSM) sont très étudiées au laboratoire ; leurs expressions et leurs rôles ont été décrits *in vitro* chez l'homme et/ou la souris. Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs publications du laboratoire depuis une dizaine d'années. Nous souhaitons étudier plus en profondeur leurs rôles *in vivo* chez la souris, seules ou en association, dans différents modèles animaux d'inflammation cutanée : de psoriasis, de dermatite atopique et d'hypersensibilité retardée. Pour mener à bien ces travaux, nous disposons de plusieurs lignées de souris transgéniques, génétiquement invalidées pour des gènes codant une cytokine et/ou un récepteur de cytokines. Nous disposons de quatre lignées de souris transgéniques, déficientes ou knock-out (KO) pour l'OSM (OSM KO), pour son récepteur (OSMR KO), pour l'IL-22 (IL-22 KO) et une lignée double KO déficiente pour l'IL-22 et le récepteur de l'IL-17 (IL-17R/IL-22 KO). L'absence d'expression de ces cytokines ou de leur récepteur chez ces souris permet d'étudier leur rôle précis et leur importance dans différentes conditions physiopathologiques. Plusieurs pathologies inflammatoires cutanées nous intéressent, pour lesquelles il existe des modèles inductibles permettant de mimer la pathologie chez la souris. Ainsi, l'application topique d'Aldara 5% (crème contenant de l'imiquimod, IMQ) sur l'oreille ou le dos de la souris pendant 5 à 6 jours est classiquement utilisée pour induire une dermatite psoriasiforme chez l'animal, reproduisant de nombreuses caractéristiques des lésions de peaux psoriasiques chez l'homme. L'application topique de calcipotriol, un dérivé de la vitamine D3, est utilisé pour induire une dermatite atopique. Enfin plusieurs protocoles d'hypersensibilités retardés ont été décrits chez la souris afin de modéliser certains eczémas de contact et consistent en l'application topique de différents agents sensibilisants sur la peau de la souris. Ces différents modèles appliqués à nos lignées de souris transgéniques, combinés à l'utilisation d'anticorps bloquants anti-cytokines nous permettront de décrire *in vivo* le rôle de chacune d'entre-elles et de tester de potentielles stratégies de blocage à visée thérapeutique.

Concernant le respect de la règle des 3R, cette étude *in vivo* utilise la souris, une espèce couramment utilisée en immuno-dermatologie. Son système immunitaire et ses réponses humorales et cellulaires ont été largement décrits depuis de nombreuses années, font référence dans le domaine et évitent d'avoir recours à des espèces mammifères plus proches de l'homme. Les modèles d'inflammation cutanée présentés dans ce projet sont bien établis, couramment utilisés par de nombreuses équipes de recherche et ont déjà fait l'objet de nombreuses publications. Le nombre maximal d'animaux inclus dans l'étude de 2100 souris a été déterminé de manière à pouvoir tester toutes les combinaisons d'animaux et de modèles d'inflammation, mais défini au plus juste pour obtenir des résultats significatifs. Enfin, la notion de raffinement a été appréhendée à travers les conditions d'expérimentation et d'élevage qui sont optimisées (hébergement en groupe, nid, enrichissement.) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales. Dans le but de réduire au maximum le stress de l'animal et la pénibilité des expériences (rasage du dos et injections/prélèvements nécessitant l'immobilité des animaux), une anesthésie sera systématiquement effectuée. Enfin, un suivi quotidien des animaux pendant la durée des expériences permettra de détecter les comportements douloureux chez les animaux. Une pesée quotidienne des animaux sera effectuée afin de détecter toute perte de poids excessive. Dans certains modèles d'inflammation, cette perte de poids, liée à une déshydratation de l'animal, sera compensée par une injection intrapéritonéale de solution physiologique stérile.

7998 Les pathologies de la myéline qui sont invalidantes, douloureuses et/ou handicapantes, peuvent entraîner des conséquences socio-économiques graves comme une perte d'emploi, un manque de productivité, une prise en charge financière élevée pour la sécurité sociale, des dépenses lourdes et une souffrance physique et psychologique majeure chez les patients et/ou leurs familles, ce qui peut générer d'autres problèmes comme la dépression ou l'anxiété pathologique. Le projet de l'Unité vise la production de connaissances dans le but d'élaborer des stratégies permettant de traiter efficacement ces pathologies. En conséquence, il apparaît logique de considérer que les activités de recherche de l'Unité prépareront des réponses directes aux questions socio-économiques générées par les pathologies de la myéline et les maladies du système nerveux. A ce titre, les objectifs du projet scientifique sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies de la myéline;

d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation; de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la réparation de la myéline et la neuroprotection et enfin, de permettre le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa.

Ces objectifs seront obtenus en réalisant les étapes suivantes quels que soient les groupes d'animaux :

- Suivi des aspects sensoriel et/ou moteur et/ou cognitif des animaux par des tests de comportements
- Mise à mort des animaux et prélèvement des différents organes pour réaliser les études in vitro.

Ce projet repose sur une base solide attestée par plusieurs publications dans des journaux de haut niveau.

Les médicaments antinéoplasiques sont couramment utilisés pour la chimiothérapie du cancer. Toutefois, l'efficacité thérapeutique de ces molécules anticancéreuses est sérieusement limitée par d'importants effets secondaires dose-dépendants que sont les neuropathies douloureuses périphériques et/ou centrales qui constituent un problème majeur de santé publique. Les neuropathies chimio-induites (NCI) peuvent survenir lors des traitements avec différentes classes de médicaments anticancéreux tels que les dérivés platinés (oxaliplatine), les taxanes (paclitaxel), les vinca-alcaloïdes (vincristine), etc. Les symptômes de la NCI sont principalement sensorimoteurs avec le plus souvent des sensations de brûlure, de picotement, une hypersensibilité au toucher ou au froid, une perte de la sensibilité proprioceptive, une diminution de la perception des vibrations ou encore des engourdissements. Les patients peuvent également subir des symptômes centraux tels que des déficits cognitifs. Il arrive que les NCI soient réversibles, mais dans de trop nombreux cas, elles persistent après la fin des traitements anticancéreux pendant plusieurs mois ou années conduisant à une diminution significative de la qualité de vie des patients.

Etant donné que les mécanismes physiopathologiques des NCI sont mal connus, les traitements actuels pour prévenir ou corriger ces NCI sont inefficaces ou inadéquats. Plusieurs tentatives sont réalisées avec divers composés neuromodulateurs pour prévenir les neuropathies chimio-induites mais les données ne sont pas exploitables, car les molécules utilisées sont-elles mêmes responsables d'effets indésirables sévères. Par conséquent, il demeure crucial d'identifier de nouvelles molécules, sans effets indésirables, pour traiter efficacement les neuropathies périphériques et/ou centrales provoquées par les anticancéreux. Compte tenu de la capacité de neurostéroïdes tels que l'Allopregnanolone à exercer des effets neuroprotecteurs in vitro et leur absence de toxicité car déjà utilisés chez plusieurs patients, nous avons émis l'hypothèse que l'Allopregnanolone et ses analogues pourraient constituer une solution thérapeutique intéressante pour lutter contre les neuropathies chimio-induites.

Le principal but du projet est donc d'utiliser une approche pluridisciplinaire et translationnelle pour développer, dans des modèles expérimentaux des pathologies de la myéline que sont les NCI, des stratégies thérapeutiques efficaces permettant de combattre des causes de déficience de la myélinisation et de souffrance axonale. Les objectifs du projet sont de disséquer les mécanismes qui sont à l'origine des anomalies de la myéline, d'utiliser de façon pertinente les outils technologiques de qualité à la disposition de l'Unité pour le suivi de l'évolution de la pathologie de la myéline et sa réparation. Il s'agit également de mettre au point des stratégies thérapeutiques à partir des modèles animaux développés pour la réparation de la myéline et la neuroprotection. Ce projet permettra le transfert d'hypothèses physiopathologiques vers la clinique et vice-versa. Les modèles animaux (rat Spague-Dawley) développés se font dans le respect des règles de 3R. Réduire : le nombre d'animaux utilisés dans les expériences de comportement est nécessaire et suffisant pour valider statistiquement les expériences (8 animaux par condition expérimentale et 3-4 animaux pour les groupes Naïfs en fonction des protocoles). Les expériences ne sont pas répétées chez les mâles et une seule fois chez les femelles pour pallier aux variations dues au cycle oestrien. Raffiner : les protocoles sont optimisés lors des expériences in vivo pour que, chez un même animal, plusieurs paramètres soient étudiés (latence de retrait de la patte suite à une stimulation thermique chaude et/ou froide; pourcentages de réponses aux filaments de Von Frey, paramètres d'étude de la motricité et/ou de la cognition). De plus, des études de biologie moléculaire, de biochimie et d'immunohistochimie sont prévues sur les tissus prélevés de ces animaux en fin de PE. Remplacer : les mécanismes biochimiques et

moléculaires mis en jeu dans nos études sont étudiés sur des cultures cellulaires. Les animaux sont surveillés tous les jours et les signes cliniques de souffrance sont évalués (posture, aspect du poil, alimentation et poids). La mise à mort des animaux est réalisée par des méthodes appropriées et autorisées et des personnes expérimentées (niveau II minimum).

Au total, le nombre de rats (mâles et femelles) est de 2114 (1664+450) animaux pour 5 ans.

7999 *Escherichia coli* est une entérobactérie le plus souvent responsable d'infections urinaires hautes (pyélonéphrite) ou basse (cystite) que ces infections soient acquises en ville ou à l'hôpital. La diffusion mondiale de souches d'entérobactéries productrices de β -lactamases à spectre étendu (BLSE) responsable d'une résistance aux céphalosporines de troisième génération pose un problème thérapeutique majeur en raison de la multi-résistance de ces souches. Ceci a conduit à une augmentation dramatique de la consommation des carbapénèmes qui restent la classe antibiotique de référence en cas d'infection sévère à entérobactérie productrice de BLSE. En conséquence, l'émergence et la diffusion de souches d'entérobactéries résistantes aux carbapénèmes est devenue une menace mondiale. Cette résistance peut impliquer plusieurs mécanisme : i) association d'une imperméabilité membranaire et/ou d'un efflux et production d'une BLSE ou d'une céphalosporinase ; ii) production de carbapénémase.

Les options thérapeutiques contre les entérobactéries productrices de carbapénémases (EPC) sont souvent limitées. Les conséquences thérapeutiques de cette résistance posent donc un problème de santé publique. La recherche de nouvelles stratégies thérapeutiques est donc indispensable.

Afin de répondre à ce défi, nous avons développé depuis plusieurs années un modèle de pyélonéphrite à *E. coli* chez la souris. Ce modèle a fait l'objet de publications dans des journaux internationaux à comité de lecture et est utilisé en routine au laboratoire.

Le modèle consiste à infecter les reins des souris pour produire une pyélonéphrite par voie ascendante, reproduisant ainsi la physiopathologie de l'infection chez l'Homme. Un cathéter est posé jusque dans la vessie par voie urétrale sous anesthésie générale et un inoculum bactérien de l'ordre de 10^7 bactéries est injecté dans la vessie dans un volume final de 50 μ l puis retiré. Pour une souche bactérienne donnée et un régime antibiotique donné, 15 souris sont utilisées. Les souris contrôles ne sont pas traitées et sont sacrifiées 48 heures après l'inoculation bactérienne. Le traitement antibiotique débute 48h après l'inoculation bactérienne et dure 24h. Les souris sont sacrifiées 24h après la dernière injection d'antibiotique (cf. infra). Les reins sont prélevés, broyés et étalés sur gélose après dilution pour déterminer les comptes bactériens et détecter l'émergence de souches résistantes.

Le projet consiste à étudier l'impact de différents mécanismes de résistance aux antibiotiques chez *E. coli* et proposer des alternatives aux traitements de référence. Sont notamment étudiés chez les souches produisant une β -lactamase à spectre élargi (BLSE) ou une carbapénémase, l'activité soit d'anciens antibiotiques utilisés seuls ou en association tels que la témocilline, la fosfomycine, les carbapénèmes (imipénème, ertapénème, méropénème), et la colistine, ou de nouveaux antibiotiques tels que l'association ceftolozane-tazobactam afin de proposer des régimes thérapeutiques efficaces en cas d'infection à germe multirésistant.

Le projet expérimental est conforme aux exigences de, réduction, de raffinement et de remplacement (« règle des 3 R »). En effet :

Réduction. Expérimentalement, nous pouvons répondre à la supériorité d'un régime thérapeutique par rapport à un autre avec 15 souris par groupe thérapeutique, grâce aux données bactériologiques quantitatives permettant des tests statistiques adaptés (cf. infra). Cette puissance statistique évite donc des expérimentations animales non concluantes. Chez l'homme, un tel résultat ne pourrait être obtenu qu'après une étude randomisée prospective en double avec plusieurs dizaines ou centaines d'individus par groupe en raison de l'absence de numération possibles des comptes bactériens dans le rein chez l'homme et l'utilisation de critères secondaires beaucoup moins discriminants que ceux utilisés chez l'animal.

Raffinement. Le raffinement est obtenu grâce au respect d'un délai d'au moins 48-72h entre l'arrivée des souris au laboratoire et le début de l'expérimentation animale, le respect des conditions optimales d'hébergement des souris (5 souris par cage), la limitation du nombre de souris traitées simultanément, l'utilisation d'une courte anesthésie générale pour permettre une cathétérisation

vésicale facile et non douloureuse et de durée très limitée dans le temps (une à deux minutes) en utilisant un modèle de pyélonéphrite ascendante chez la souris femelle. Ce modèle n'entraîne pas de bactériémie (cultures de rates stériles), donc pas de souffrance liée au sepsis et pas de mortalité pendant la durée de l'expérimentation.

Un point limite a été défini, le plus précoce possible, après 24 heures de traitement, pour toutes les souris. Le sacrifice des animaux est programmé sans attendre d'aggravation de l'état des souris.

Remplacement. La complexité du mode d'infection rénal dans la pyélonéphrite ascendante et la variabilité des concentrations antibiotiques dans les reins et les urines rendent pour l'instant le remplacement de ce modèle expérimental par des modèles in vitro ou in silico non réalisable.

Le projet dure 5 ans et le nombre de souris est de 1500.

8000 Ce projet concerne un enseignement à l'utilisation de l'animal de laboratoire, dans le cadre d'une formation professionnelle diplômante à la recherche préclinique et clinique : au-delà des enseignements théoriques et dirigés, la réalisation en vraie grandeur d'une étude utilisant des animaux permet de confronter les étudiants à des éléments concrets relatifs à l'hébergement et à l'utilisation des animaux, en vérifiant leur attitude et leur technicité.

Les étudiants auront durant leur semestre de formation à concevoir une étude en fonction de la littérature, la planifier, la réaliser puis l'interpréter, en s'appuyant sur des référentiels reconnus. Les compétences acquises pendant la formation seront donc à la fois scientifiques (conception, réalisation et interprétation statistique d'une étude), opérationnels (gestion de projet et démarche qualité) et éthiques (respect du bien-être animal et de la démarche 3R).

Le thème de l'étude est choisi par l'équipe pédagogique chaque année, parmi 3 prévus par ce projet (effet d'un analgésique sur une colite induite par une molécule d'origine microbienne, comparaison de méthodes d'anesthésie ou d'analgésie, ou effet de médicaments psychoactifs sur le comportement), de façon à répondre à ces objectifs, mais aussi pour apporter une contribution à la démarche 3R de l'institution (communication sur les améliorations apportées, production de données exploitables par d'autres équipes de l'établissement ou de vidéos pour des enseignements qui n'utiliseront pas d'animaux.).

Les dommages subis par les animaux durant le projet sont mis en balance des objectifs pédagogiques recherchés :

- Les animaux sont hébergés selon les conditions recommandées pour l'espèce, en groupes, dans un environnement enrichi, et ils sont suivis quotidiennement par les étudiants, en accord avec le responsable du bien-être animal de l'établissement. Une phase d'acclimatation est prévue.
- Les étudiants pratiquent pendant une semaine un protocole d'administration de substances et d'examens cliniques et comportementaux, en fonction du thème. La gravité du protocole est classée légère ou modérée selon que les substances administrées peuvent provoquer ou non des troubles cliniques ; des points limites précoces seront appliqués en cas de souffrance.
- Les animaux seront mis à mort à la fin de l'étude pour effectuer une autopsie, à la fois utile pour obtenir des données complémentaires et pour la formation des étudiants.

Les exigences de remplacement, réduction et raffinement correspondent aux éléments suivants :

- La souris a été choisie car les étudiants doivent acquérir une expérience pratique avec une des espèces mammifères utilisées dans les études précliniques. La lignée, le sexe et l'âge des animaux sont choisis pour chaque thème de façon à minimiser l'impact clinique ; ce projet prévoit aussi d'utiliser des souris exclues d'autres projets en raison d'un génotype inadapté.
- Le nombre d'animaux est limité au maximum à 50 par étude (soit 250 souris au total pour les 5 ans d'enseignement prévues par ce projet) : ce nombre est calculé pour permettre une analyse statistique de 4 à 5 conditions expérimentales avec une puissance suffisante et pour permettre à tous les étudiants de se former sans solliciter excessivement chaque animal.
- Les techniques sont réalisées en respectant les recommandations adaptées aux études précliniques ; les modalités d'anesthésie et analgésie seront définies avec un vétérinaire de l'établissement. A noter que les étudiants auront suivi au préalable la formation théorique et pratique

à la fonction de concepteur. L'équipe pédagogique ainsi que le personnel de l'animalerie encadreront ces travaux d'un point de vue scientifique et technique quotidiennement.

8001 Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes qui sont responsables de la synthèse des mélanines, pigments photo-protecteurs contre les rayons UV du soleil. Le mélanome est une tumeur extrêmement agressive possédant un fort potentiel métastatique. S'il est diagnostiqué assez précocement, une chirurgie peut suffire à le traiter. Cependant, dès lors qu'il y a apparition de métastases, le pronostic vital devient très négatif en raison de l'inefficacité de tous les traitements actuels. Le mélanome, qui ne représente que 5% des cancers cutanés, entraîne alors 80% des décès associés à ce type de cancer. Actuellement, son incidence double tous les 10 ans, ce qui en fait un réel problème de santé publique.

Récemment des thérapies ciblées ont été développées mais les réponses restent transitoires car elles ne ciblent pas tous les mélanomes. D'autres thérapies ont été mises en place telle que l'immunothérapie qui va réactiver la réponse immunitaire du patient mais ces thérapies ne donnent une réponse positive que pour 10 à 30% des patients.

Il est donc nécessaire de développer de nouveaux traitements ou de nouvelles associations de molécules ayant déjà obtenues leur AMM (exemple : DABRAFENIB, TRAMETINIB).

Nous proposons aussi d'étudier l'impact de la lactate déshydrogénase (LDH) sur ces nouvelles combinaisons. En effet la LDH est marqueur pronostiques péjoratif de la survie des patients atteint de mélanome ainsi qu'un marqueur prédictif de mauvaise réponse aux thérapies ciblées et aux immunothérapies.

Pour notre étude nous allons utiliser une molécule anti-PD1 (traitement immunothérapie) et il est donc indispensable d'avoir un système immunitaire fonctionnel. De ce fait nous ne pouvons réaliser cette étude in silico ou in vitro. Nous ne pouvons non plus la réaliser sur des souris Nude qui sont habituellement utilisées pour les études in vivo en cancérologie car elles sont immunodéficientes. C'est pour cette raison que nous avons choisi des souris commerciales C57Bl6J qui elles possèdent un système immunitaire fonctionnel. Ces souris seront injectées avec des cellules tumorales de même espèce, pour éviter les réactions de rejet liées au système immunitaire fonctionnel. Les cellules seront injectées en sous cutané, sur un seul flanc ce qui permet de suivre très facilement la croissance tumorale. Cette procédure d'injection n'est pas douloureuse pour l'animal mais sera cependant réalisée sous anesthésie afin de limiter le stress et d'améliorer l'homogénéité des injections. Une fois l'injection réalisée, le comportement des animaux sera suivi quotidiennement de façon à assurer une bonne gestion de la douleur, le tout en accord avec les objectifs de notre étude. L'ensemble de cette étude a été conçue pour respecter la règle des 3R et limiter au maximum le stress et la souffrance des animaux.

RAFFINEMENT : Les procédures expérimentales peuvent engendrer une douleur modérée, pour limiter cette douleur nous avons établi une grille d'observation visant à définir des points limites à partir desquels l'expérience sera arrêtée et qui indiquent les mesures que nous prendrons à l'apparition des premiers signes de douleur. Toutes ces mesures sont prises pour limiter au maximum la souffrance des animaux tout au long de l'expérimentation.

REDUCTION : Une étude exhaustive de la littérature a été menée avant d'initier ce projet pour s'assurer de la non reproduction de résultats déjà publiés. Le nombre d'animaux utilisé lors des expériences est calculé pour utiliser le minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs et donc éviter de dupliquer les procédures. Nous avons réalisé des tests sur des cellules en culture pour prouver la non toxicité de nos composés (BRAFi, MEKi, LDHi) et définir les meilleures conditions d'utilisation des composés que nous souhaitons tester sur l'animal.

REMPACEMENT : Seul les modèles animaux permettent de tester la collaboration qui existe entre les différents compartiments cellulaires (cellules de l'immunité, cellules des muqueuses). Ainsi la faisabilité et l'efficacité d'une nouvelle approche à visée thérapeutique ne peut se faire que chez l'animal surtout lorsque nous voulons tester les nouveaux traitements « immunothérapie » pour lequel un système immunitaire est indispensable. De plus l'expérimentation in vivo nous permet d'appréhender les effets secondaires liés à l'administration de ces combinaisons de traitement. Nous ne pouvons donc remplacer cette expérimentation par une approche in silico ou in vitro.

Dans ce cadre la souris est utilisée. Nous testerons au maximum 3 doses des différentes drogues impliquées dans cette études (BRAFi / MEKi/ anti PD1 / LDHAI /LDHBI) sur ce modèle tumoral. Pour cela nous avons besoin de 415 animaux.

8002 La formation des concepteurs qui utilisent des animaux à des fins scientifiques comprend l'apprentissage de procédures non ou faiblement invasives, telles que l'administration de substances et les prélèvements sanguins. Les stagiaires apprennent ces gestes chez un animal vivant sous la supervision d'un enseignant confirmé pour acquérir un geste efficace et sans stress ni pour l'animal, ni pour l'opérateur.

L'enseignement pratique avec animaux vivants ne concerne que les espèces que les stagiaires sont amenés souvent à utiliser en recherche biomédicale, à savoir le rat et la souris. Les deux espèces sont utilisées pour que les stagiaires soient sensibilisés à la prise en compte des variations spécifiques. Les stagiaires formés à la direction d'études précliniques ont également un apprentissage concernant le lapin.

Toutefois, en accord avec la démarche de remplacement, les bases sont d'abord acquises à l'aide de méthodes alternatives comme les vidéos commentées et les mannequins d'entraînement.

Les techniques enseignées respectent l'état de l'art, et en particulier les recommandations de raffinement publiées par les associations professionnelles. Les enseignements sont réalisés dans les locaux d'animalerie, ce qui assure de bonnes conditions de travail avec le matériel adéquat, dans un environnement familier pour les animaux qui sont habitués par une période d'acclimatation. Les enseignements sont organisés en petit groupe, avec un ratio enseignant/stagiaire élevé pour s'assurer que chaque geste est bien réalisé. Les stagiaires sont conscients des précautions à prendre pour respecter le bien-être des animaux. L'anesthésie locale ou générale est utilisée avant les prélèvements sanguins. De ce fait, l'enseignement n'occasionne pas de douleur aux animaux.

Le nombre des animaux est réduit grâce à une réutilisation raisonnée, tout en limitant le nombre d'anesthésies et le nombre d'injections par animal. Toutes formations confondues, pour former environ 600 personnes pendant 5 ans, nous estimons que nous utiliserons au maximum 500 souris, 150 rats et 20 lapins.

8003 L'objectif de cette étude est d'observer les différences comportementales et physiologiques chez le modèle porcin (porcs conventionnels Sus Scrofa en croissance) soumis à un stress psychosocial et exposé ou non à un additif alimentaire dans l'aliment durant 8 semaines, en étudiant ses effets au niveau de l'axe intestin-cerveau et des comportements. Quatre groupes expérimentaux de 12 animaux seront constitués, menant à un total de 48 animaux (mâles et femelles, 25 kg en début d'expérience). Dans trois groupes, les animaux seront soumis à un stress psychosocial qui a été validé dans une précédente étude. Celui-ci fait intervenir l'isolement social, l'absence d'enrichissement du milieu, et l'exposition à des sons stressants et lumières (gyrophares) diffusés de manière aléatoire. Dans l'un de ces groupes, les porcs recevront un aliment de croissance standard ; dans les deux autres, les animaux recevront le même aliment supplémenté d'un additif alimentaire à base d'extraits végétaux (différent pour les deux groupes). Un quatrième groupe d'animaux sera constitué, hébergés par paires dans un milieu enrichi. Les animaux seront soumis à des tests comportementaux permettant d'étudier la réactivité comportementale face à des situations de stress aigu et/ou de nouveauté. Des prélèvements de salive (à 5 reprises) et de sang (à 2 reprises) seront réalisés sur ces animaux pour dosage de cortisol, hormones gastro-intestinales, et autres marqueurs biologiques. Des échantillons de fèces seront également prélevés à 2 reprises pour l'étude du microbiote intestinal et de son activité.

A ces 12 animaux par groupe s'ajouteront 8 autres par groupe pour les trois groupes en condition de stress psychosocial qui ne seront pas soumis aux différents tests comportementaux et prélèvements. Le groupe nourri avec l'aliment standard ainsi qu'un des deux autres groupes supplémentés avec un additif (sélectionné sur la base des effets observés pendant les tests comportementaux et sur des marqueurs biologiques) seront soumis à une session d'imagerie cérébrale par Tomographie d'Emission Positronique (TEP). Celle-ci permettra de cartographier le métabolisme basal du cerveau après une exposition chronique à des additifs alimentaires, potentiellement anxiolytiques et stimulateurs de l'appétit. Durant l'imagerie, les animaux seront maintenus à un niveau léger

d'anesthésie générale sous isoflurane de façon à prévenir tout mouvement, et placés sous respirateur mécanique et monitoring permanent. Toute cette étude a été conçue de manière à respecter la législation française et européenne en vigueur pour l'expérimentation animale et répond aux impératifs des 3R. REMPLACER : cette étude portant sur les effets d'un stress psychosocial et d'une stratégie anxiolytique (additifs alimentaires), il est impératif d'utiliser des animaux vivants et vigiles pour explorer leur comportement et les réponses de l'axe intestin-cerveau. REDUIRE : pour les données physiologiques, comportementales et d'imagerie récoltées au cours de cette étude, les effectifs envisagés représentent un minimum raisonnable pour obtenir des différences significatives entre les différents traitements. Cela permettra une analyse par ANOVA multifactorielle. RAFFINER : Des points limites sont fixés au préalable, et un suivi des animaux est effectué de façon très régulière. La procédure d'anesthésie lors de l'imagerie cérébrale a été conçue et validée par un vétérinaire.

8004 Détecter précocement les rechutes de l'insuffisance cardiaque est un enjeu de santé publique majeur. Nous proposons une approche originale qui consiste à implanter par voie endoscopique, dans la zone de la paroi gastrique la plus proche possible du cœur, un dispositif miniaturisé capable de recueillir des grandeurs physiques caractérisant l'activité du cœur, et de les transmettre à une station de recueil capable de les interpréter pour déclencher une réaction médicale appropriée si une rechute d'insuffisance cardiaque est détectée.

Les paramètres à mesurer sont en particulier l'activité électrique, l'activité mécanique, et la saturation en HbO₂ de la paroi gastrique. L'activité électrique se mesure entre deux électrodes implantées dans l'estomac, qui peuvent être des clips gastriques. L'activité mécanique se mesure par un accéléromètre, qui peut être extrêmement miniaturisé. La saturation en HbO₂ se mesure par un dispositif optique simple et lui aussi facilement miniaturisable. La communication des informations à l'extérieur du patient peut se faire par divers protocoles, en particulier par le protocole « Blue Tooth Low Energy », capable d'être mis en œuvre dans un dispositif miniaturisé. Enfin, la batterie nécessaire au fonctionnement du dispositif peut également être très réduite, comme l'a montré l'expérience acquise en clinique sur les « leadless pacemakers ».

Par ailleurs, il a été démontré que l'insuffisance cardiaque s'accompagne d'une réponse du système nerveux autonome à une stimulation électrique transcutanée, qui se traduit par une variation du rythme cardiaque selon un pattern différent de celui observé en l'absence d'insuffisance cardiaque. Cette variation est particulièrement intéressante à étudier pendant le sommeil. Ce qui renforce l'intérêt pour un dispositif implanté permettant des mesures sur tout le nyctémère.

Nous travaillons donc à la conception d'un Dispositif d'Investigation Cardio-Respiratoire (DICR) miniaturisé, implantable par voie endoscopique dans l'estomac, et capable de mesurer et de transmettre l'activité du cœur, en analysant des signaux électriques, mécaniques et de saturation de la paroi gastrique en HbO₂. Nous avons déjà conçu un prototype d'un tel dispositif, qui n'intègre pas encore à ce jour la possibilité de transmettre sans fil les paramètres recueillis.

L'objectif principal de cette étude est de démontrer que des signaux, d'une qualité suffisante pour caractériser précisément l'activité du cœur, peuvent être acquis par cette approche, y compris lors d'une stimulation électrique intra gastrique. Pour cette preuve de concept, les signaux acquis seront transmis par des fils électriques fins tunnélisés jusqu'à un relai fixé sur la peau de l'animal. Ce relai permettra la communication sans fil jusqu'à une station située à proximité des données acquises.

L'étude du DICR sur un modèle animal (mini-porc "Yucatan"), en raison des nombreuses similitudes anatomo-physiologiques, qui rapprochent l'organisme du mini-porc à celui de l'homme, permet d'obtenir une comparaison fiable des données obtenues et une meilleure compréhension des phénomènes physiopathologiques.

L'implantation du DICR dans la paroi gastrique se fera sous anesthésie générale. Pendant la phase de récupération post-chirurgicale un protocole est mis en place pour prévenir d'éventuels processus douloureux. Les mesures proprement dites sont non-invasives. Elles sont réalisées après récupération complète des animaux et un retour à une alimentation normale.

Un maximum de 12 animaux sera nécessaire pour cette preuve de concept. Les premiers essais permettront d'évaluer la faisabilité du recueil des paramètres caractérisant l'activité cardiaque par le DICR implanté.

8005 Chez les mammifères dont les êtres humains, les réponses immunes aux greffes et aux tumeurs sont des phénomènes complexes auxquels participent plusieurs types de cellules du système immunitaire. Une des particularités des cellules immunitaires est leur mobilité et leur capacité de migration entre différents tissus et au sein des organes. Les approches *in vitro* ont permis de faire progresser nos connaissances mais ne permettent pas d'explorer cette dynamique des réponses immunes. Celle-ci a pu être étudiée ces dernières années grâce au recours à des animaux de laboratoires (rongeurs de laboratoire, embryons de poissons zèbres) et à de nouvelles technologies telles que la microscopie bi-photonique.

Ce projet a pour but d'étudier la dynamique des cellules immunitaires dans trois modèles qui miment des pathologies cliniques fréquentes : 1) rejet de la greffe de peau, 2) la réaction du greffon contre l'hôte (GVHD) qui survient après la greffe de certaines cellules souches hématopoïétiques et 3) le lymphome B de Burkitt.

Ces phénomènes mettent en jeu de multiples cellules et tissus et ne peuvent être étudiés que dans un organisme entier, ce qui justifie le recours à des modèles animaux, en particulier la souris dont le système immunitaire est bien connu et proche de celui de l'homme. Nous aurons recours à différentes lignées transgéniques de souris exprimant des protéines fluorescentes qui seront visualisées dans les tissus par microscopie bi-photonique, ce qui requiert que ces cellules soient fluorescentes. Ces souris transgéniques sont également des sources de cellules fluorescentes transférables à des souris receveuses. Ces expériences *in vivo* viennent compléter des données produites *in vitro*, et réciproquement.

Les expériences d'imagerie permettent d'obtenir des multiples données lors de chaque acquisition et sur chaque animal utilisé, ce qui permet d'en réduire le nombre, tout en obtenant des données statistiquement significatives. Au total, sur les 5 années du projet, nous prévoyons d'étudier 1696 souris dans huit procédures expérimentales. L'anesthésie générale sera utilisée à chaque fois que possible. Tout sera mis en œuvre pour minimiser l'impact des procédures sur le bien-être des animaux. Une grille de score de la douleur sera appliquée pour déterminer les points limites à appliquer.

Ce projet nous apportera une connaissance beaucoup plus précise du fonctionnement des cellules immunitaires dans les greffes.

8006 L'appréhension de notre environnement se fait en majeure partie grâce au sens de la vision. Le système visuel est un modèle d'organisation de grande complexité permettant de retranscrire 70% des informations perçues par le cerveau. Chez l'homme, de nombreuses maladies neurodégénératives conduisent à une diminution de la vision, jusqu'à la cécité. En particulier, le glaucome, qui touche 4,5 millions de personnes et dont sa prévalence ne cesse d'augmenter. Le glaucome provoque la mort des neurones ganglionnaires de la rétine (qui constitue le nerf optique) ce qui induit une cécité progressive bien souvent décelée tardivement. Les neurones ganglionnaires ne se régénèrent pas, et actuellement, aucun traitement n'existe pour induire une survie et une repousse de ces neurones du système nerveux central. Récemment, de nombreuses études ont mis en avant la possibilité de repousse liée aux molécules impliquées dans le développement du nerf optique. Or, actuellement, très peu de molécules sont identifiées comme étant responsables du développement des voies visuelles. L'objectif de ce projet collaboratif est d'étudier le rôle de 100 gènes, sélectionnés principalement à partir de la collection de lignées issues du consortium IMPC (International Mouse Phenotyping Consortium) et d'explorer leur implication dans le développement des projections visuelles. Avec pour but de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques pour des maladies neuro dégénératives tel que le glaucome. Les individus porteurs de mutations seront isolés durant le processus d'élevage lors de l'établissement de la cohorte de phénotypage dans le cadre du projet. Afin de respecter le principe de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R » : -Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux. -Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis soit 3 animaux par lignée (soit 300 souris au total). -La complexité des circuits neuronaux du système visuel est telle que les études ne peuvent se faire *in vitro*.

8007 Les neurocristopathies forment un groupe hétérogène de maladies liées à des anomalies de différenciation, migration, survie cellulaire des cellules des crêtes neurales. Les cellules des crêtes neurales sont issues du tube neural de l'embryon (future moelle épinière) et sont à l'origine de nombreux dérivés comme les os et cartilage de la face, le système nerveux périphérique et les mélanocytes (cellules pigmentaire de la peau). Les signes cliniques des neurocristopathies sont multiples : malformations de la face, retard mental, surdité, malformation des yeux, défauts de pigmentation et des défauts de fonctionnement du système nerveux périphérique. Les principales neurocristopathies sont le syndrome CHARGE, le syndrome de Treacher Collins, le syndrome de Waardenburg et le syndrome de DiGeorge. Notre équipe travaille sur un médiateur cytoplasmique dont nous avons antérieurement montré le rôle essentiel pour la formation de la tête des vertébrés. Son absence conduit à des malformations cranio-faciales sévères et d'autres manifestations cliniques qui permettent de dresser un tableau très proche des neurocristopathies humaines. Ce médiateur est essentiel à la différenciation et la survie de ces cellules issues des crêtes neurales.

De nombreuses publications tendent à montrer que, bien que ces maladies aient des origines génétiques diverses, leur sévérité est liée au niveau d'activité d'un gène suppresseur de tumeur majeur.

Nous souhaitons tester l'hypothèse suivante : "les caractéristiques cliniques de notre modèle, très proches des neurocristopathies humaines, sont modulables par l'altération de l'activité de ce gène suppresseur de tumeur". Nous renforcerions ainsi notre hypothèse sur le rôle des dysfonctionnements de notre médiateur dans le développement de ce type de pathologie. Nous étudierons aussi les interactions très peu connues entre notre médiateur et ce gène suppresseur de tumeur.

Pour cela il nous faut maintenir un élevage de souris dont l'inactivation du gène de notre médiateur est conditionnée au stade de développement embryonnaire correspondant au début de la migration des cellules des crêtes neurales.

Dans le cadre d'une autre demande d'autorisation, nous souhaiterions les croiser avec des souris portant l'inactivation d'une des deux copies d'un gène suppresseur de tumeur d'intérêt. Nous aurons alors à notre disposition la lignée de souris qui nous permettra de commencer notre étude.

Réduire-remplacer : La première approche est menée dans un modèle cellulaire de cellules de crêtes neurales isolées mais in fine, nous ne pouvons pas substituer un modèle cellulaire à ce modèle animale car il s'agit de développement embryonnaire complexe pour lequel il étudie ex-vivo ou en culture cellulaire est impossible.

Raffinement-Réduction : Le noyau d'élevage sera réduit au minimum requis pour obtenir le nombre d'animaux nécessaire aux croisements avec d'autres lignées. En cas d'atteinte des points limites, des mesures seront prises afin d'éviter toute souffrance inutile.

Nous générerons 240 souris au total au cours des 5 ans dont 60 auront un phénotype dommageable et font l'objet de la présente demande.

8008 Dans le cadre de la formation spécifique destinée aux personnes concevant ou réalisant les procédures expérimentales, le programme prévoit des travaux pratiques (TP) qui illustreront les cours magistraux. Les thématiques de ce TP sont : la réalisation de procédures faiblement invasives (anesthésie, biopsie musculaire et prélèvement de sang en veine jugulaire). Ces séances de TP sont réalisées sur des mini-porcs. La formation est approuvée par le ministère pour 3 ans. Ainsi le nombre total de cochons vivants utilisés pour ce TP est de 9 sur 3 ans.

Dans le cadre de ce TP, les élèves assisteront à une anesthésie chimique (induction par voie intramusculaire et maintien par voie intraveineuse), un prélèvement sanguin dans une veine jugulaire et une biopsie au niveau d'un muscle de la cuisse. Pour chaque session annuelle, le nombre d'animaux utilisés pour chaque TP sera adapté au nombre de participants. Les interventions sont réalisées sous anesthésie générale. Les animaux ne sont utilisés qu'une fois dans le cadre du TP. Les interventions étant faiblement invasives, ils peuvent le cas échéant être réutilisés dans le cadre d'un autre protocole expérimental.

La formation proposée s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. En effet, le nombre d'animaux a été calculé au plus juste

tout en restant dans les conditions pédagogiques acceptables. Au vu de la formation proposée, celle-ci ne peut clairement pas être effectuée grâce à une méthode alternative.

8009 La consommation excessive d'alcool est la première cause de maladies métaboliques du foie en France. L'atteinte du foie (atteinte hépatique) débute par une stéatose (accumulation de graisses dans les hépatocytes) qui peut évoluer en hépatite alcoolique durant l'abus d'alcool. La maladie peut ensuite évoluer vers des formes plus sévères, la cirrhose et le cancer du foie. Parmi tous les patients alcooliques, tous ne développent pas les formes sévères de la maladie alcoolique du foie. Il existe donc d'autres facteurs que la seule consommation excessive d'alcool qui interviennent dans la genèse des lésions hépatiques. La recherche de facteurs qui participent à cette susceptibilité individuelle est donc cruciale pour trouver de nouvelles pistes thérapeutiques. Il a récemment été démontré que le microbiote intestinal (bactéries présentes dans notre tube digestif) participe à la survenue des lésions du foie au cours de l'alcoolisation et que la composition du microbiote influe donc sur la sévérité des lésions du foie dans l'alcoolisme chronique. On sait par ailleurs que les macrophages hépatiques sont des cellules qui vont être activées au cours de l'hépatite alcoolique et que limiter cette activation prévient la progression des lésions hépatiques.

Les acides biliaires sont produits d'une part par le foie mais également par le microbiote intestinal. La composition du microbiote aura donc un effet sur la composition en acides biliaires. Les acides biliaires, outre leur rôle de détergent permettant la digestion des graisses, sont également impliqués dans la régulation du métabolisme énergétique. Cette fonction des acides biliaires passe par la liaison à des récepteurs qui vont relayer leurs effets, dont le récepteur TGR5 (Takeda G protein-coupled bile acid receptor 5) présent sur les macrophages. L'activation de ce récepteur dans les macrophages permet de limiter leur activation. Ce récepteur pourrait donc représenter une cible thérapeutique de choix.

Nous utiliserons d'une part des souris déficientes pour TGR5 afin de démontrer que son absence aggrave la maladie alcoolique du foie dans un modèle murin d'alcoolisation et d'autre part des agonistes de ce récepteur pour prouver son effet bénéfique. La complémentarité de ces expériences permettra de prouver son intérêt. L'alcoolisation se fait de manière séquentielle sur 4 semaines, pour que les souris s'adaptent progressivement à l'alcool, afin de minimiser la toxicité de l'alcool. Les souris ont plusieurs jours d'adaptation au régime puis une alcoolisation progressive, permettant à l'organisme de supporter le protocole tout en minimisant les dommages potentiels.

Les complications hépatiques observées au cours de la maladie alcoolique du foie mettent en jeu des interactions entre les différents organes qu'il est actuellement impossible de reproduire in vitro. Il nous faut étudier l'effet de l'alimentation en particulier l'alcool sur les bactéries intestinales, l'effet de ces bactéries sur la barrière intestinale et au final l'impact de cette atteinte sur le développement des lésions du foie. Le seul modèle auquel nous pouvons avoir recours est l'animal (Remplacement). Le rongeur, ici la souris, partage bon nombre de processus cellulaires avec l'Homme et un modèle d'alcoolisation largement décrit dans la littérature existe chez la souris et est couramment utilisé par notre équipe.

Nous tenons compte de la règle des 3R (Réduction, Raffinement et Remplacement) au cours de nos différentes procédures. Nous avons défini des points limites qui permettent d'évaluer l'arrêt du protocole pour l'animal en souffrance en particulier concernant le taux d'alcoolisation. Pour chaque procédure et durant toute la période d'hébergement, nous veillons au bien-être animal en élaborant des méthodes permettant de réduire, supprimer, soulager l'angoisse et la détresse subies par les animaux. Cependant l'enrichissement classiquement utilisé étant en cellulose et ayant un impact sur le microbiote intestinal, nous avons investi dans des enrichissements en plastique dur et la quantité de sciure dans la cage est augmentée afin de permettre aux animaux un enfouissement suffisant. Au total ce projet nécessite l'utilisation de 240 animaux, nombre d'animaux qui est réduit au minimum, mais suffisant pour pouvoir faire des comparaisons et des statistiques exploitables.

8010 Le modèle « rat » est particulièrement pertinent pour l'étude de la toxoplasmose humaine. En effet, cet agent parasitaire infecte tous les animaux à sang chaud et les caractéristiques physiopathologiques chez cet animal sont très proches de celles retrouvées chez l'homme (ce qui n'est pas le cas de la souris). Des études scientifiques récentes montrent qu'il existe des rats

complètement réfractaires (rat LEW par exemple) et, à l'opposé, des rats sensibles à la toxoplasmose (rat BN par exemple). Plusieurs équipes scientifiques ont réussi à identifier l'implication d'un gène NLRP1 dans cette différence de sensibilité. Au niveau cellulaire, les macrophages péritonéaux ont été associés à cette différence. Cependant, au niveau digestif (porte d'entrée du parasite), nous ne savons pas si seuls les macrophages sont responsables de cette différence ou si d'autres cellules (épithélium digestif, cellule M) sont impliquées dans cette résistance/sensibilité. Pour essayer de mieux comprendre le mécanisme d'entrée du parasite, nous proposerons l'expérimentation suivante qui ne peut être réalisée qu'à partir d'un modèle in vivo chez l'animal. Nous utiliserons des rats de sensibilité connue (soit sensible, soit résistant). Les souches de rats résistantes qui pourront être testées sont : LEW, WKIO, WF, BN-Cg, les souches de rats sensibles sont : BN, F344, DA, LEW-F.

Nous utiliserons plusieurs souches de parasites (Type 1, 2, 3, exotique) pour vérifier que la virulence de la souche n'impacte pas le mécanisme d'entrée.

Nous réaliserons 2 manipulations différentes chez chacune de ces souches :

-Groupe 1 (4 animaux), infestation focalisée par technique d'anse intestinale sans réveil puis quantification et histologie à la 8ème heure (recherche du parasite et de sa localisation cellulaire et tissulaire). Ce protocole correspond à une expérimentation sans réveil.

-Groupe 2 à 3 (4 animaux pour chacun), infection puis quantification et histologie (ganglion mésentérique et intestin grêle) à J3, J7. Après infection, 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.

En limitant à son maximum l'effectif de chaque groupe, nous aurons besoin de 4 animaux par groupe X 3 groupes, X4 souches de T. gondii X 8 souches de rats à tester soit un total de 384 rats maximum. Cet effectif est réduit à son maximum sans mettre en péril l'interprétation statistique des résultats. Certains points pourront être supprimés si inutiles ou redondants (si plus de parasite par exemple après J3) et en fonction des résultats obtenus.

Par ailleurs, les animaux sont hébergés en groupes harmonieux; dans un environnement enrichi (copeaux, matériel de nidification, bâtonnets à ronger). Enfin, l'eau et la nourriture sont mises à disposition "ad libitum" et de la musique est diffusée en salle d'hébergement pour diminuer le stress et atténuer les bruits environnementaux. Après anesthésie, l'atteinte de points limites prédéfinis entrainera l'euthanasie des animaux.

8011 En 2010, seuls 20% des prélèvements multi-organes ont abouti à un prélèvement pulmonaire (données de l'Agence de Biomédecine, ABM) du fait d'une évaluation fonctionnelle jugée insuffisante. Ceci conduit à une inadéquation entre les besoins théoriques et le nombre de greffes réalisées et à une augmentation du temps d'attente sur liste. Ainsi 21 décès sont survenus sur liste en 2010 (données ABM).

La mortalité à 3 mois post-opératoire de transplantation pulmonaire, essentiellement liée aux lésions d'ischémie-reperfusion, a été évaluée à 15% en 2010. L'ischémie-reperfusion correspond aux lésions tissulaires liées à l'arrêt puis la reprise de la perfusion d'un organe et est une des principales causes de défaillance primaire du greffon (DPG).

Des travaux antérieurs en transplantation rénale et hépatique ont démontré que la perfusion hypothermique continue de liquide de préservation, en diminuant les lésions d'ischémie reperfusion, est un moyen de préservation optimal. Elle a été évaluée sur de longues durées de préservation (48h), avec de meilleurs résultats comparée à la préservation statique froide. L'hypothèse biologique est que la perfusion hypothermique ralentit le fonctionnement cellulaire et limite les lésions de reperfusion.

Nous voulons donc élaborer une technique de préservation pulmonaire sur 48h par perfusion hypothermique dynamique, qui aurait un impact majeur sur les problèmes d'accessibilité des greffons, en permettant le prélèvement de greffons provenant de donneurs marginaux (meilleure évaluation fonctionnelle, car autorise une plus longue durée d'observation et possibilité d'améliorer ces organes) et par la même occasion de résoudre les problèmes logistiques liés au délai d'ischémie froide, c'est-à-dire la période qui débute au refroidissement de l'organe par injection de solution de préservation

et pendant laquelle l'organe est préservé dans la glace. En effet, cette période ne doit pas excéder 6 heures et c'est pendant celle-ci qu'a lieu le transport de l'organe.

Remplacement : Avant de tester cette technique prometteuse pour l'Homme, il est crucial d'appréhender au préalable la faisabilité de cette approche sur un modèle animal. Nous ne pouvons évaluer cette technique sur un modèle *in vitro* ou *ex-vivo* qui ne peuvent retranscrire la complexité des réponses physiologiques d'un organisme vivant. En effet, il n'existe aucune méthode alternative pour évaluer la survenue de lésions d'ischémie-reperfusion et de défaillance primaire du greffon. Concernant les maladies cardiovasculaires et respiratoires, le porc constitue un modèle de choix en santé humaine de par l'existence de caractéristiques et de propriétés anatomiques et physiologiques comparables à celles de l'Homme.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été calculé à l'aide d'une approche statistique (programme statistique G Power 3.0). Le rapport P/F a été retenu comme critère d'évaluation de l'efficacité de la technique. Le calcul du nombre d'animaux a été fait de façon à mettre en évidence un rapport P/F 50% plus grand dans le groupe perfusion hypothermique par rapport au groupe préservation statique, avec un risque bêta à 20% et un risque alpha à 5%.

Ce calcul a abouti au nombre de 24 animaux pour les 4 groupes, soit :

- groupe préservation froide dynamique, N = 6
- groupe préservation froide statique, N = 6
- groupe ischémie chaude, N = 6
- groupe contrôle, N = 6

Compte tenu du risque de mortalité de la réimplantation pulmonaire des groupes préservation froide et durant la reperfusion pour le groupe ischémie chaude, nous augmentons de 10 % le nombre d'animaux dans ces trois groupes. Le nombre total d'animaux s'élève donc au maximum à 27 animaux pour cette étude.

Cependant dès que nous arriverons à 6 animaux par groupe nous arrêterons les inclusions d'animaux dans ce protocole. De plus nous exploiterons, dans la mesure du possible, les résultats des animaux utilisés dans une autre étude en cours, pour les animaux du groupe contrôle. Le chercheur responsable est un chirurgien thoracique spécialisé en transplantation pulmonaire ce qui permet d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire ainsi le nombre d'animaux sacrifiés. Nous avons choisi d'évaluer notre technique sur un modèle d'auto-transplantation pulmonaire afin de réduire le nombre d'animaux et d'améliorer la qualité de nos résultats en supprimant les phénomènes de rejet.

Raffinement : L'ensemble de cette procédure sera réalisé sous anesthésie générale par un mélange couvrant les composantes hypnotiques et antalgiques de l'anesthésie.

Afin de tenir compte des besoins quotidiens de nos animaux et d'améliorer leur bien-être, les porcs auront une nourriture adaptée, seront stabulés en groupe tant que cela est possible et leur environnement sera enrichi (activité de foussement encouragée, médecine ball, jeux dans le couloir, planche à gratter, distributeur d'aliment actif.).

D'autres mesures seront prises :

- Acclimatation d'une semaine minimum avant d'entrer dans le protocole
- Observations quotidiennes par une personne compétente basées sur l'apparence physique externe, le comportement (sociabilité, appétit) et les réponses comportementales aux stimuli externes (peu enclins aux manipulations, tentative de fuite). Ces contrôles sont enregistrés et permettent de repérer tout animal malade ou blessé pour prendre les mesures appropriées.
- Procédures expérimentales réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (chirurgiens séniors, techniciens anesthésistes) permettant un temps interventionnel réduit au maximum.
- Contrôle biquotidien en postopératoire par une personne compétente avec évaluation de la douleur. L'évolution du score permet de noter l'amélioration ou l'aggravation de l'état de l'animal et de prendre les mesures appropriées.
- Tout constat d'un mal-être est remonté au responsable du bien-être des animaux pour examens approfondis et traitements adaptés. Si la douleur, la souffrance et l'angoisse ne pouvaient être

réduites à leur minimum (augmentation du score), une décision d'interruption d'expérimentation sera prise.

- modèle d'auto-transplantation : pas de nécessité de drogues immunosuppressives, car pas de phénomène de rejet.

- les autres organes (cœur, œsophage), seront destinés à d'autres expérimentations.

8012 Les maladies cardio-vasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. L'OMS estime à 17,5 millions le nombre de décès imputables aux maladies cardio-vasculaires, soit 31% de la mortalité mondiale totale. Développer un nouveau traitement de réparation vasculaire est donc un enjeu de taille de santé publique.

Aujourd'hui, la thérapie cellulaire reste le meilleur espoir pour la reconstruction vasculaire. En effet, de nombreuses études montrent l'efficacité de deux populations de cellules sur la réparation vasculaire : 1-une population de cellules endothéliales s'intégrant directement au sein des nouveaux vaisseaux et 2- une population de cellules favorisant ce phénomène d'intégration aux vaisseaux et permettant une réparation vasculaire plus rapide. Ces deux populations sembleraient donc être de bons candidats pour développer de nouvelles approches innovantes de thérapies cellulaires dans le cadre des pathologies vasculaires.

Cependant, il a été démontré que ces cellules issues de patients atteints de maladies cardio-vasculaires sont plus rares et moins fonctionnelles, rendant la thérapie cellulaire autologue (du même individu) peu efficace. La thérapie hétérologue (d'un individu à un autre) serait donc la meilleure stratégie à envisager mais elle nécessite un traitement immunosuppresseur pour éviter le rejet de la greffe, traitement présentant de nombreux effets secondaires.

De nouveaux travaux montrent que ces mêmes cellules provenant du cordon ombilical (périnatales) sont plus nombreuses, plus fonctionnelles et possèdent un pouvoir immunosuppresseur. L'utilisation des cellules périnatales permettrait donc la formation des nouveaux vaisseaux sans l'utilisation de médicaments immunosuppresseurs.

Nous voudrions ainsi évaluer ces cellules périnatales en termes de tolérance et d'efficacité chez des souris ayant un système immunitaire normal.

Cette étude est importante car elle apportera la preuve que ces cellules constitueraient un outil innovant de thérapie cellulaire pour les maladies vasculaires.

Cette étude se fera chez la souris adulte mâle immunocompétente et comportera 2 procédures pour un total de 210 souris. La procédure 1 a pour objectif de s'assurer de la viabilité et de la tolérance des cellules périnatales humaines chez la souris. En cas d'échec de la procédure 1 (150 souris) démontrant soit la mort soit le rejet des cellules injectées, le protocole sera arrêté réduisant le nombre de souris utilisées pour cette étude.

Uniquement en cas de succès de la procédure 1, la deuxième procédure (60 souris) sera réalisée. Cette procédure 2 a pour objectif d'évaluer la fonctionnalité des cellules périnatales humaines en visualisant la formation de nouveaux vaisseaux chez la souris.

Des résultats préliminaires in vitro nous ont permis de démontrer l'immunotolérance et le pouvoir immunosuppresseur des cellules périnatales. L'utilisation de l'animal est cependant indispensable pour valider ces résultats en conditions expérimentales au plus près de la réalité biologique avant d'envisager la mise en place d'une étude clinique avec ce produit de thérapie cellulaire innovant.

La séquence des procédures limite le nombre d'animaux puisqu'un échec de la 1ère procédure (150 souris) arrêtera le projet. Le modèle choisi pour la procédure 2 permet de faire une cinétique d'un mois sur les mêmes animaux limitant ainsi le nombre d'animaux inclus et améliorant la pertinence des résultats.

La chirurgie est pratiquée sous anesthésie générale et la douleur péri-opératoire est traitée.

Procédure 1 : traitement antidouleur par voie orale (dans l'eau de boisson).

Procédure 2 : traitement antidouleur et anti-inflammatoire par voie sous-cutanée avant l'incision de la peau et à la fin de la chirurgie, avant le réveil.

De l'enrichissement sera ajouté dans la cage et de la nourriture gélifiée sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress ni de douleur.

L'imagerie des animaux de la procédure 2 se fera sous anesthésie générale, 2 fois par semaine afin de caractériser les modifications anatomiques et suivre l'apparition du réseau vasculaire tout en respectant un temps de récupération suffisant entre 2 périodes d'acquisition.

Le nombre total d'animaux est de 210 répartis sur les 3 ans du projet.

8013 Le syndrome de Prader-Willi (PWS) est une maladie neuro-développementale rare très invalidante qui se traduit par des troubles de la prise alimentaire et des déficits cognitifs graves. Ce syndrome résulte de l'absence d'une partie d'un chromosome qui contient plusieurs gènes, en particulier le gène *Magel2* dont la délétion chez l'homme conduit à un sous-type de PWS nommé Schaaf-Yang syndrome (SYS). L'ensemble des symptômes du PWS indique un déficit du système qui régule la production d'ocytocine (OT) dans le cerveau. D'ailleurs, nos collaborateurs ont montré qu'un traitement court par inhalation d'OT pendant une semaine chez des enfants PWS de moins de 6 mois permet d'améliorer considérablement, de façon durable, leur comportement social. Nous disposons au laboratoire de souris dans lesquelles le gène *Magel2* est délété (*Magel2^{m+/p-}*) dont 50% meurent à la naissance par défaut de succion du lait maternel. Les 50% survivantes présentent, chez le mâle, des troubles de comportement social. Aussi bien la mortalité à la naissance que les troubles de comportement des adultes sont prévenus par une injection quotidienne d'OT pendant la première semaine post-natale.

Notre projet consiste à étudier les neurones ocytocinergiques qui projettent dans le cerveau, au cours du développement postnatal, afin de déterminer les mécanismes responsables du trouble observé chez les souris *Magel2^{m+/p-}*. Pour ce faire, nous enregistrerons l'activité électrique et synaptique de ces neurones dans des tranches de cerveau issues de 270 souris (Contrôles, *Magel2^{m+/p-}* injectées ou non dès la naissance avec de l'OT) en cours de développement (0 à 21 jours). La technique du patch clamp ex vivo que nous utiliserons permet d'éviter le traumatisme d'une expérimentation in vivo. En parallèle, nous étudierons ex vivo la morphologie de ces neurones chez 45 souris (même groupes que pour l'électrophysiologie) grâce à un marqueur fluorescent injecté dans le neurone pendant l'enregistrement. La comparaison de la morphologie et des activités électrophysiologiques enregistrées dans des tranches issues de souris contrôle et de souris *Magel2^{m+/p-}* traitées ou non à l'ocytocine pendant la période postnatale va nous permettre de mieux comprendre les raisons du déficit fonctionnel du système ocytocinergique des souris *Magel2^{m+/p-}* et donc de donner des pistes aux médecins pour mettre au point un traitement efficace du SYS, voire de plusieurs syndromes impliquant un trouble du développement du système OTergique (PWS, autisme). Le fait d'utiliser une expérimentation in vitro, après sacrifice d'animaux anesthésiés, est une technique de raffinement qui permet d'éviter les souffrances. Puisqu'il s'agit d'étudier le développement de neurones et de leur implication dans un circuit, l'ensemble de la structure cérébrale doit être préservée, ce qui empêche d'utiliser des techniques de remplacement par cultures cellulaires. Enfin, tout sera fait pour réduire le nombre d'animaux utilisés, en particulier en tentant de multiplier le nombre de cellules étudiées pour chaque animal sacrifié et/ou d'étudier la morphologie des neurones qui auront été utilisés pour l'électrophysiologie.

8014 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, certaines donnant naissance à des génomes défectifs, qui constituent des particules défectives interférentes (DIP). Des études en culture cellulaire ont démontré que l'infection virale est atténuée lorsque la proportion de DIP est élevée. Des génomes défectifs produits et encapsidés in vitro seront donc susceptibles d'interférer avec le virus entier après administration chez l'individu - ce qui constituerait une nouvelle approche antivirale.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de déterminer si cette approche, qui est prometteuse en culture cellulaire, peut protéger contre l'infection. Il serait également nécessaire de déterminer les conditions d'administration idéales pour avoir l'effet antiviral désiré- la dose, la voie d'administration, le temps de traitement. Seules les DIPs les plus performantes en culture cellulaire seront caractérisées chez l'animal. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles ou mâles âgées de 5 à 6 semaines. Un maximum de 1220 souris sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos

analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 5 ou 6 pour chacune des procédures expérimentales et de temps d'analyse (3 temps : 3, 5 et 7 jours post-infection). En tout, 5 procédures expérimentales seront réalisées qui seront répétées un maximum de trois fois, et 1 procédure répétée jusqu'à 6 fois, et dont le degré de sévérité est léger à modéré.

Nous allons étudier l'innocuité du traitement (administration des DIPs sans infection) et l'effet antiviral des DIPs contre l'infection par le virus Zika. Nous utilisons un modèle murin développé et décrit dans la littérature. L'infection létale est asymptomatique pendant les 5 premiers jours. Pour nos expériences, une infection sous-létale sera réalisée, ce qui permettra de réduire les symptômes et les risques de souffrance. Les souris seront suivies quotidiennement pendant les 7 jours d'infection. Les souris seront mises à mort avant le prélèvement d'organes pour déterminer la charge virale.

8015 Les rayonnements ionisants sont à ce jour un outil incontournable de l'arsenal thérapeutique de la cancérologie. En France, chaque année, 60% des cancers sont traités par radiothérapie externe soit environ 180 000 patients. Les pratiques de radiothérapie en routine imposent l'optimisation des doses délivrées au volume tumoral cible de façon à obtenir la meilleure efficacité thérapeutique possible tout en réduisant « autant que possible » la dose délivrée au tissu sain environnant la tumeur et assurer ainsi la qualité du traitement. Malgré les nombreux progrès dans ce domaine, il est important de noter que la radiothérapie s'accompagne fréquemment d'effets secondaires en raison de la présence de tissus normaux dans le champ d'irradiation. Certains de ces effets disparaissent spontanément alors que d'autres apparaissent de façon inéluctable. La toxicité radio-induite aux tissus sains est donc un facteur limitant dans l'escalade de dose pouvant être délivrée à la tumeur. Cependant, sa sévérité peut affecter la qualité de vie des survivants du cancer qui sont de plus en plus nombreux. Cinq ans après traitement, 5 à 10 % des patients développent encore des complications tardives plus ou moins sévères de leur radiothérapie, soit un nombre de patients estimé en France entre 9 000 et 18 000 par an. Bien que cette technique présente un niveau de sécurité élevé, les incidents et accidents de radiothérapie survenus ces 5 dernières années rappellent que la radiothérapie, si elle est insuffisamment maîtrisée, peut conduire à des conséquences graves pour la santé des patients.

L'objectif de cette étude sera de développer une stratégie thérapeutique innovante afin de traiter la cystite radique suite à l'application d'un protocole de radiothérapie. Cette étude vise particulièrement à apporter des preuves de concept précliniques de l'utilisation des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pour le traitement de la cystite radique. Pour évaluer l'effet des CSM sur les lésions de la vessie, il est nécessaire d'utiliser un modèle intégré in vivo. De plus, l'effet de ces traitements, pour qu'ils soient pertinents, nécessitent leur interaction avec les différents compartiments comme le rein, condition retrouvée chez le modèle animal intégré. Après vérification de la qualité des CSM, des rats seront soumis à une irradiation locale au niveau de la vessie puis traités par injection de cellules souches (CSM). Les effets de l'irradiation seront suivis à long terme (jusqu'à 12 mois). La dose d'irradiation sera minimisée afin de limiter les effets secondaires sur l'animal. L'effet de la thérapie cellulaire sur les animaux irradiés sera ainsi comparé aux séquelles observées chez les animaux non traités.

Au total 705 rats seront nécessaires à l'aboutissement de ces expérimentations. Le nombre d'animaux est basé sur le nombre statistique d'animaux nécessaire par groupe et sur l'expérience du laboratoire sur les procédures d'irradiation. Les animaux seront suivis tout au long des procédures expérimentales afin de limiter toute souffrance ou douleur.

8016 L'objectif du présent programme à long terme est d'étudier les stratégies énergétiques d'oiseaux marins s'alimentant par plongée (manchots, cormorans, pétrels), ces espèces jouant un rôle majeur dans les chaînes alimentaires de l'océan Austral. Une approche pluridisciplinaire est menée pour répondre à des problématiques de recherches fondamentales et appliquées en écologie, physiologie et en éthologie (comportement de déplacement, de plongée et de prédation). Les deux questionnements principaux sont les suivants :

1/ Comment ces animaux à respiration aérienne et à sang chaud (endothermes), épargnent leur énergie pendant leurs longs voyages alimentaires en mer (eau à moins de 10°C) et au cours de leur plongées alimentaires (plusieurs minutes à plusieurs centaines de mètres de profondeur) ?

2/ Comment ces animaux vont s'adapter aux perturbations de la chaîne alimentaire de l'océan Indien, en conséquence des modifications climatiques très rapides des régions polaires ?

Dans les deux cas, les réponses sont physiologiques et comportementales. Pour les étudier, il est nécessaire d'équiper quelques individus de ces espèces de microsystèmes d'acquisition de données embarqués (« les loggers »), cette approche moderne étant la seule adaptée au suivi de la faune sauvage libre de ses mouvements (appelée le « Bio-logging »).

Ces loggers sont placés de façon externe (fixés aux plumes du dos ou à un harnais) quand il s'agit de mesurer leurs activités de plongée (dans les 3 dimensions de l'espace) ou les paramètres physiques de leur milieu (luminosité, salinité, température de l'air ou de l'eau). Les données sont accumulées dans les mémoires du logger et récupérées au retour à terre de l'animal. Une alternative, par exemple pour la localisation des animaux en mer, est l'utilisation de balises Argos et de GPS, l'information arrivant directement au laboratoire via les satellites.

Afin d'évaluer leur dépense énergétique et de comprendre leurs adaptations physiologiques à la plongée en apnée, où pour mesurer leur prise alimentaire, les individus sont équipés sous anesthésie générale (gazeuse) de loggers mesurant la fréquence cardiaque et des températures internes. Les opérations se font selon des protocoles rigoureux, mis à jour régulièrement avec nos collègues vétérinaires, dans le plus grand souci de l'intégrité physique et physiologique de l'animal. Les avantages de ces expérimentations concernent l'acquisition de connaissances scientifiques indispensables à la meilleure compréhension des adaptations remarquables de ces champions de la plongée, mais aussi pour les retombées appliquées dans les domaines de la biologie de la conservation et des applications possibles dans le biomédical.

Objectifs du programme pour la période considérée de 4 ans:

1/ Comprendre les stratégies de chasse en eau profonde (et sans lumière) chez le manchot royal adulte en mer.

2/ Tester l'influence de la taille corporelle sur les capacités de plongée, selon une approche fonctionnelle et évolutive. Des oiseaux d'âge et de sexe différents, sélectionnés selon des critères de tailles corporelles, seront équipés de loggers et suivis pendant la saison de reproduction, ou bien sur une période pouvant atteindre trois années d'enregistrement : sous manip Immatures (Manip LuL-immature) et sous manip Adultes en hiver. 3/ Tester différents systèmes de marquage permanent « piercing & tatouage » sur des individus adultes. Quarante-huit adultes et 30 immatures de Manchot royal au plus seront expérimentés sur cette période de 4 ans.

- Exigence de remplacement : il n'est pas possible de répondre à ces problématiques d'adaptations écophysiologiques de l'animal à son milieu sur des modèles animaux de laboratoire ; et pour ce qui concerne les adaptations particulières aux milieux polaires et à la plongée, il n'y a pas de modèle plus justifié, éthiquement et scientifiquement, que le manchot royal.

- Exigence de réduction et de raffinement : Les animaux sont capturés, manipulés et équipés dans le plus grand respect de leur bien-être, pour des raisons éthiques évidentes mais aussi pour ne pas modifier leur comportement en mer, ni leur succès reproducteur. Par ailleurs, le nombre d'individus choisi est toujours restreint au strict minimum, permettant une approche statistique solide : 12 au maximum par groupe expérimental pour des questions d'écophysiologie, jusqu'à 30 pour des questions d'écologie où l'on rencontre une plus grande variabilité interindividuelle. Ces exigences éthique et scientifique sont rendues possibles par la grande expérience de notre équipe, impliquée depuis maintenant 35 ans dans le domaine du bio-logging sur les oiseaux marins. Il en est ainsi pour ce qui concerne l'évitement du stress de capture et contention, de douleur pendant la manipulation (anesthésie générale), ou après relâché pendant la phase de suivi via les loggers, en mer. Les conséquences sur la survie et sur les populations de cette espèce au statut de protection intégrale sont évaluées sur le long-terme et font partie des considérations prises en compte aussi par le Comité d'Environnement Polaire, qui donne son feu vert pour établir les dérogations préfectorales nécessaires à ce type d'expérimentations dans les TAAF.

8017 Plusieurs études suggèrent que des pathologies génétiques caractérisées par des retards mentaux sont plus vulnérables à divers stress cellulaires (stress oxydants, physiques, chimiques.) et de fait développent plus fréquemment des maladies tels que des cancers ou maladies neurodégénératives.

Les causes sont encore inconnues, cependant cette susceptibilité aux stress semble être la conséquence d'une dérégulation des voies du stress dont les facteurs de transcription HSF, facteurs de réponse aux stress, joue un rôle central. L'amélioration de la prise en charge de ces pathologies mentales repose donc sur une meilleure compréhension des mécanismes qui régulent les voies du stress.

L'objectif de ce projet vise à déterminer la contribution des facteurs de stress dans la susceptibilité aux stress des pathologies associées à des retards mentaux.

Nous nous intéressons en particulier à deux pathologies caractérisées par des retards mentaux le syndrome de Down (SD, trisomie 21) et de Rubinstein-Taybi (RTS) dans lesquels les facteurs de réponse aux stress, HSFs, sont dérégulés.

Dans le but de déterminer la contribution des HSFs dans les RTS et SD, nous génèrerons des cellules souches pluripotentes humaines induites (iPSC) et nous étudierons leurs capacités à se différencier en neurones et à réagir aux stress.

Pour cela, nous disposons de fibroblastes humains de patients RTS et SD ainsi que de fibroblastes humains déficients pour les facteurs HSFs qui seront reprogrammés en cellules iPSC (cellule souche pluripotente induite). Les différentes iPSC générées doivent ensuite être soigneusement testées pour leurs propriétés de pluripotence et leurs potentiels de différenciation in vitro mais également in vivo, en particulier pour tester leurs capacités à se différencier en 3 feuillets embryonnaires. Ce qui se traduit chez la souris par la formation d'une tumeur bénigne des cellules embryonnaires ou tératome. Pour cette étude, nous utiliserons 227 souris sur 5 ans.

La bonne reproductibilité et le très faible taux d'échec (5%) de ces modèles expérimentaux permettent de limiter le nombre d'animaux par groupe. La règle des 3R (réduction, raffinement, remplacement) a été respectée et des points limites ont été mis en place en plus de l'observation régulière du comportement des animaux afin d'identifier toute souffrance et douleur.

Une majeure partie des travaux de ce projet sera réalisée in vitro en culture cellulaire. Cependant, une des caractéristiques nécessaire témoignant d'une reprogrammation complète est la différenciation in vivo des cellules iPSC en trois feuillets embryonnaires conduisant à la formation d'un tératome. Il est donc indispensable d'associer, aux études in vitro, des études chez l'animal pour valider la pluripotence des cellules iPSC.

8018 L'ensemble de ces expérimentations s'inscrit dans la formation d'étudiants ingénieurs en génie biologique de second cycle. L'objectif de ces études est de compléter les cours détaillés sur les grands principes de régulation des fonctions physiologiques avec le concept de régulation in vivo et plus précisément sur la transformation d'énergie chimique en énergie mécanique. A l'issue de cet enseignement, l'étudiant sera donc capable de définir les principaux mécanismes physiologiques et de dialoguer avec les acteurs du monde médical. Il est essentiel de former ces futurs ingénieurs en génie biologique aux tests en conditions réelles sur animal vivant et à l'observation de gestes techniques non simulés comme la pose d'électrodes ou de capteur de force, afin de les préparer et les rendre plus performant dans leurs futurs domaines de compétence. Cette formation a également pour but de confronter les étudiants à l'expérimentation animale et de les sensibiliser au bien-être animal et plus particulièrement sur la notion des 3R (réduction, remplacement, raffinement)

Dans le cadre de ces travaux pratique ces 3 notions ont servi de piliers pour construire cette procédure le plus éthiquement possible.

(1) Réduction

Le nombre d'animaux utilisés a été réduit au plus faible possible (Réduction) tout en permettant à chaque participant de pouvoir réaliser dans de bonnes conditions les techniques expérimentales sous le contrôle d'un enseignant formé à l'expérimentation animale. Soit 3 rats par séance à raison de 4 séances par an pour un total de 12 rats par année et 60 rats pour les 5 ans du projet

(2) Remplacement

Les méthodes alternatives (remplacement) comme les vidéos ou modèles numériques ont servi de support pour les cours mais ne permettent pas de former les étudiants à certains gestes techniques comme l'anesthésie c'est pourquoi il est essentiel de les former aux conditions réelles et non simulées.

(3) Raffinement

Les animaux sont commandés une semaine avant le début des travaux pratique. Dès leurs réceptions les rats sont examinés puis stabulés en cages ventilées avec un environnement enrichi (papier cardé) et une visite quotidienne est effectuée afin de garantir leur bien-être. Le jour précédant l'expérimentation, les animaux sont mis à jeun. Le jour de l'expérimentation, un enseignant ou un personnel qualifié, isole les rats puis les anesthésie individuellement par une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine-kétamine. Une fois l'anesthésie profonde constatée les animaux sont amenés en salle de TP où ils seront canulés et cathérisés par l'enseignant. Les étudiants sont alors autorisés sous surveillance constante à procéder à des injections de substances par la voie veineuse (canule) et à recueillir des prélèvements sanguins artériels (cathéter) afin de mesurer l'impact des hormones sur la glycémie. Pendant toute la durée de l'expérimentation l'enseignant veillera au maintien de l'anesthésie par des doses de maintien à intervalles réguliers (toutes les 30 minutes) mais également au bon déroulement de l'expérimentation.

8019 L'objectif du projet est d'évaluer la biocompatibilité et l'efficacité de biomatériaux implantés in vivo chez le rat dans des défauts osseux générés dans la calvaria. La calvaria étant un os plat, elle est donc un site privilégiée d'étude lorsque le matériau testé a pour but d'être utilisé en cas de reconstruction osseuse d'un os plat comme la mandibule ou le crâne, ou pour mimer une reconstruction dentaire.

La biocompatibilité des biomatériaux sera évaluée selon la norme ISO 10993-6 "Evaluation biologique de dispositifs médicaux - essais concernant les effets locaux après implantation"

La présente procédure concerne l'évaluation de la biocompatibilité et/ou du potentiel ostéoformateur de biomatériaux implantés dans des défauts osseux induits dans des calvaria chez le rat. Les biomatériaux sont implantés dans des défauts osseux de 5 mm de diamètre, générés dans l'os pariétal gauche. Les souches de rats utilisés pourront être des rats Wistar ou Sprague Dawley. Des rats immunodéficients pourront également être utilisés si la nature des matériaux est susceptible d'induire un rejet. Enfin des rats mâles seront privilégiés mais selon les cibles cliniques choisies pour les différents matériaux testés, des femelles pourront être choisies également. Dans tous les cas les animaux devront être âgés de 7 à 9 semaines au moment de la chirurgie.

Deux à trois points de cinétique sont généralement évalués avec la mise à mort d'animaux à chacun des points de cinétique. Des prélèvements sanguins peuvent être réalisés en cours des protocoles à raison d'un prélèvement par semaine au maximum afin de mesurer le taux de biomarqueurs osseux dans le sang et d'évaluer la toxicité systémique des différents principes actifs par une analyse NFS par exemple. De même, des analyses radiographiques pour localiser les biomatériaux et évaluer la reconstruction osseuse ou la formation d'os ectopique peuvent être réalisées au cours du protocole. Afin d'évaluer la vitesse de néoformation osseuse dans les défauts, les animaux recevront une double injection de fluorochromes (Calcéines et Xylénol) par voie sous-cutanée avant leur euthanasie (4 et 14 jours avant sacrifice). Les fluorochromes ont la capacité de fixer l'os en cours de minéralisation. L'analyse ultérieure des marquages fluorescents au site osseux permet de déterminer la dynamique de formation osseuse au niveau des défauts et autour des matériaux.

La durée des procédures est de 12 semaines maximum. A la mise à mort, une analyse macroscopique du site d'implantation sera réalisée et ces derniers seront prélevés pour une analyse en imagerie et histologique.

A chaque étude, 10 sites d'implantation par point de cinétique/par condition seront évalués selon les recommandations de la norme ISO 10993-6.

Au minimum 3 conditions seront testées :

- condition 1 = création défauts osseux sans implantation
- condition 2 = implantation du matériau d'essai

- condition 3 = implantation d'un matériau standard

Etant donné qu'un seul défaut est généré par rat et que 2 points de cinétiques minimum sont évalués, un total minimum de 60 rats est requis par étude. Au maximum, 100 rats pourront être inclus dans une étude (4 groupes supplémentaires soit l'évaluation de 4 matériaux d'essai en plus).

Sur la base de la réalisation de 3 études par an sur 5 ans, 1500 animaux maximum seront nécessaires.

Les implantations entraînant de la souffrance, un protocole analgésique sera mis en place le jour de la chirurgie, en période per-opératoire et post-opératoire (une injection 30 minutes à 1h, avant l'acte chirurgical, puis 6-8h plus tard et le lendemain). De plus la chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale (Mélange Kétamine-Xylazine).

Les radiographies éventuelles seront également réalisées sous anesthésie fixe et les prélèvements sanguins pourront être réalisés sous anesthésie gazeuse (mélange air-isoflurane).

Dans le cas où des signes de douleur seraient observés lors du suivi clinique, un traitement analgésique adapté sera administré aux animaux. Dans le cas où ces signes ne pourraient être évités par quelque traitement analgésique ou qu'ils seraient accompagnés d'une perte de poids sévère, l'animal sera automatiquement mis à mort.

Cette étude sera menée dans le respect de la règle des 3R. Les biomatériaux sont généralement testés in vitro au préalable mais le passage chez l'animal reste indispensable afin de vérifier les interactions avec l'organisme (Remplacement). Le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'avoir des résultats exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude pour confirmer les résultats obtenus au cours du présent projet (Réduction).

La douleur sera bloquée dès le début de l'anesthésie générale et une analgésie sera réalisée en postopératoire. Les points limites ont été définis afin d'éviter toute souffrance inutile. Si les points limites sont atteints, les animaux concernés seront exclus du protocole et mis à mort. Les rats seront stabulés en groupe dans des locaux adaptés (Raffinement) permettant de maintenir les animaux dans un environnement adéquat et n'induisant pas de stress. Ils seront suivis quotidiennement afin de détecter tout signe de détresse et/ou de douleur. Si tel est le cas un traitement analgésique sera appliqué.

8020 Dans le cadre de la prise en charge thérapeutique des patients atteints d'hydrocéphalie, la mesure précise du débit cérébrospinal est primordiale, or il n'existe pas à ce jour de technique non invasive fiable. Notre projet expérimental propose une technique innovante pour la mesure du débit dans une dérivation ventriculo-péritonéale sous-cutanée destinée aux patients atteints de cette pathologie. Chez ces patients équipés d'une valve réglable qui évacue le liquide cérébro-spinal grâce à un cathéter placé sous la peau, le dispositif proposé permettrait de mesurer le débit à l'intérieur de la tubulure sans avoir recours à la chirurgie ou à toute autre méthode intrusive.

Après validation de notre dispositif ex vivo et sur modèle rongeurs, il apparaît maintenant indispensable de prouver son efficacité sur un modèle vivant de taille suffisante pour recevoir le dispositif destiné aux patients, dans des conditions de masse thermique comparables à celles qui seront rencontrées en clinique. L'expérimentation proposée sera ainsi réalisée sur six jeunes porcs anesthésiés sur lesquels seront placés transitoirement le long du flanc un cathéter sous-cutané, le temps de la mesure.

Dans le respect de la règle des 3R, chaque geste chirurgical sera répété deux fois sur les animaux, de chaque côté du corps, afin de limiter l'effectif du lot expérimental. Après cicatrisation des tissus, l'expérimentation ne donnant lieu à aucune séquelle, ils pourront être utilisés lors d'un autre protocole expérimental compatible avec leur utilisation antérieure, en accord avec le vétérinaire chargé du suivi de leur bien-être.

Tout au long de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être de ces porcs qui seront hébergés en groupes sociaux de 2 ou 3 animaux dans un environnement enrichi adapté aux besoins de cette espèce. L'état de santé des porcs sera vérifié quotidiennement et des traitements antalgiques seront administrés au moment opportun pour éviter toute souffrance

des animaux. Lors de l'expérimentation, l'anesthésie des animaux, associée à un traitement antalgique, permettra d'éviter tout stress et toute souffrance lors de la chirurgie.

8021 L'accident vasculaire cérébral (AVC) représente la troisième cause de mortalité et la première cause de handicap acquis de l'adulte dans les pays industrialisés. Il survient à la suite de l'obstruction (accident ischémique) ou de la rupture (accident hémorragique) d'un vaisseau sanguin et provoque la mort des cellules nerveuses par privation d'oxygène et des éléments nutritifs. Cette privation est également à l'origine de la formation d'un œdème cérébral, principal cause de mortalité en cas d'AVC. La formation de l'œdème cérébral est la conséquence de deux mécanismes conjoints : le dysfonctionnement des canaux présents dans les membranes cellulaires qui induit l'entrée massive d'eau dans les cellules cérébrales et l'altération de la barrière hémato-encéphalique (BHE) qui induit l'infiltration de plasma. L'ischémie mais également la restauration du flux sanguin sont à l'origine d'une inflammation cérébrale qui provoque l'augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique (BHE), permettant l'infiltration de leucocytes participant à la formation de l'œdème. Actuellement le seul traitement efficace pour faire face à l'œdème cérébral est l'hémicraniectomie, une chirurgie décompressive qui consiste à ouvrir un large volet crânien permettant l'expansion du tissu œdémateux. Des essais précliniques d'un inhibiteur de molécules du cycle cellulaire, les cyclines kinases dépendantes, ont récemment montré un effet anti-œdémateux dans un modèle d'ischémie focale transitoire chez le rat par introduction d'un monofilament dans l'artère cérébrale moyenne. L'objectif de ce projet est de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique permettant de limiter la formation de l'œdème en cas d'accident ischémique cérébral. Nous étudierons l'effet de cet inhibiteur sur l'état de la BHE en cas d'ischémie focale cérébrale, ainsi que sur l'infiltration des leucocytes et la réponse inflammatoire. Au total, 260 animaux seront inclus dans ce projet, 20 rats pour la formation préliminaire de l'expérimentateur et la mise en place de la technique d'analyse de la barrière hémato-encéphalique et 240 rats supplémentaires pour étudier les mécanismes impliqués dans les effets anti-œdémateux de la molécule à travers plusieurs expériences : Analyse in-vivo de la barrière hémato-encéphalique, analyse tissulaire et moléculaire pour caractériser l'infiltration cellulaire et l'activation inflammatoire au cours de l'œdème. En accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement, des tests in vitro ont permis de sélectionner la molécule et de définir une gamme étroite de concentrations à tester in vivo. Une étude pilote réalisée chez l'animal a préalablement permis d'ajuster la dose et de tester différentes voies d'administration en vue de réduire le nombre d'animaux utilisés. Afin de limiter le stress et la douleur des animaux, une période d'acclimatation d'une semaine sera respectée à leur arrivée. Ils seront hébergés collectivement, en milieu enrichi avec un tunnel en PVC. Afin de pallier à la douleur occasionnée par la chirurgie un analgésique sera administré.

A terme, ce projet pourrait permettre de développer une nouvelle stratégie thérapeutique pour la prise en charge précoce des AIC.

8022 L'objectif de ce projet de recherche est de tester des stratégies alimentaires innovantes, utilisant une légumineuse "multifonctionnelle", le sainfoin, pour la nutrition et la santé du lapin en croissance et de l'adulte reproducteur. L'objectif finalisé du projet est la réduction de l'usage de médicaments en élevage cunicole, tout en optimisant les performances de croissance.

Le programme scientifique est basé sur la réalisation d'une étude, comprenant 2 essais.

Il s'agit d'étudier la valeur nutritionnelle du sainfoin chez le lapin en croissance, ainsi que ses effets potentiellement protecteurs sur la santé digestive du lapereau (parasitisme). L'objectif est de mesurer la teneur en nutriments digestibles (énergie et protéines) pour 2 qualités de sainfoin (d'où 2 essais), et en fonction de son taux d'incorporation dans l'aliment. Ces 2 essais seront réalisés, chacun en cage à métabolisme individuelle pour 4 groupes de 10 lapereaux, entre le sevrage (5 sem.) et l'âge de vente (10 sem.), soit un total de 80 lapins élevés pendant 35 jours.

Le projet porte sur la précision des besoins nutritionnels des lapereaux avant le sevrage. Il n'est donc pas possible d'obtenir les informations désirées sans le recours aux animaux ni à d'autres types d'animaux. La modélisation de ces réponses biologiques n'est pas possible à ce stade par manque de données permettant l'implémentation des modèles. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, le nombre minimum d'animaux nécessaires a été calculé d'après la variabilité de la variable la plus

importante (digestibilité de la matière sèche : 2 à 4%). Ceci permet de mettre en évidence des écarts potentiels de 5 à 10% entre le groupe témoin et les groupes expérimentaux. Afin d'éviter toute forme de souffrance liée à la manipulation de l'animal lors des mesures (pesée et examen de l'état de santé général), le matériel est adapté à la taille de l'animal au moment de la mesure qui est réalisée par une personne formée, compétente et entraînée pour assurer une manipulation bienveillante de l'animal jusqu'à l'atteinte d'un état de calme permettant une mesure précise. Le logement en cage individuelle nécessaire à l'étude, permet néanmoins une relation visuelle et une communication sonore et odorante entre les animaux.

8023

Au cours du siècle dernier, l'intensification des activités humaines s'est accompagnée d'une accumulation de CO₂ dans l'atmosphère de notre planète. En se dissolvant dans les océans, ce surplus de CO₂ entraîne une baisse du pH et de la teneur en carbonate des eaux marines, processus connu sous le nom d'acidification des océans. Combiné au réchauffement général du climat, l'acidification actuelle des océans menace des espèces marines. Cette étude (PH-STRESS) fait partie d'un projet dont les objectifs généraux sont de mieux comprendre les réponses physiologiques et comportementales des populations de poissons face à l'acidification progressives des océans.

Dans ce contexte, PH-STRESS vise à analyser la réponse endocrine (hormonale) au stress du bar Européen (*Dicentrarchus labrax*) exposés à deux conditions de pH différentes : pH témoin (pH 8, condition actuelle) et pH 7,6 (condition prévue pour 2100). La réponse physiologique à un stress aigu (test de confinement, procédure 1), sera évaluée en dosant les concentrations de cortisol (hormone du stress) dans le plasma et de neurotransmetteurs dans le cerveau de poissons après mise à mort de poissons prélevés. En complément, nous analyserons l'expression des gènes responsables de la régulation de cette réponse hormonale.

Le nombre total d'animaux est de 64.

Le projet prend en compte la règle éthique des 3Rs :

- Remplacer : Il n'existe pas d'alternative à cette expérimentation animale car nous recherchons précisément d'identifier si les réponses physiologiques au stress aigu des poissons dépendent des conditions du pH de l'eau.

- Réduire : Le nombre d'animaux est adapté au mieux pour permettre des analyses statistiques fiables malgré la variabilité de la réponse hormonale entre les individus. L'utilisation d'individus juvéniles (sexuellement immatures) contribue à réduire encore ce nombre en écartant la prise en compte d'un effet sexe (à cause de l'effet d'hormones sexuelles sur la libération de cortisol).

- Raffiner : Les conditions d'élevage sont optimales pour l'espèce. Toutes les manipulations sont pensées expressément pour réduire au maximum le stress des animaux. De cette façon nous garantissons le bien-être des animaux. Le bien être va être évalué par la valeur basale (avant le test du stress) de cortisol plasmatique obtenue à t₀ (poissons n'ayant pas subi le stress aigu de confinement). L'expérimentation et les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié en respectant les règles d'hygiène, de sécurité et d'éthique.

8024 Pour devenir des gamètes fécondables et aptes au développement embryonnaire, les ovocytes doivent accomplir deux divisions cellulaires asymétriques, aboutissant à la formation de deux petites cellules appelées globules polaires. Ces divisions permettent à l'ovocyte de ne conserver qu'une seule copie du génome maternel, permettant de recouvrer un état diploïde après la fécondation. Les mécanismes moléculaires qui contrôlent l'accomplissement de ces divisions asymétriques sont encore méconnus. Chez l'humain, certaines formes d'infertilité sont associées à des défauts d'émission des globules polaires, suggérant un dysfonctionnement des mécanismes de la division asymétrique. Pour élucider les causes possibles de ces anomalies, nous étudions les divisions asymétriques de l'ovocyte, en utilisant le modèle souris. En particulier, nous étudions le rôle de protéines impliquées dans le remodelage du cortex de l'ovocyte. Nos expérimentations reposent essentiellement sur des techniques d'imagerie de fluorescence ainsi que sur des approches biochimiques. Les ovocytes sont collectés un par un après dissection des ovaires ou oviductes. La mise en œuvre de ce projet nécessitera un total de 2000 animaux. Nous respectons la règle des 3Rs

comme suit : Réduire : les souris sont soumises à une superovulation par injection d'hormones, afin de réduire au maximum le nombre d'animaux requis ; Raffiner : les souris sont hébergées dans des cages réglementaires, avec un maximum de 5 animaux par cage, nourriture et eau ad libitum, et avec surveillance quotidienne par le personnel de l'animalerie et/ou les membres de l'équipe ; Remplacer : nous interrogeons les mécanismes moléculaires du fonctionnement des ovocytes, nos expérimentations ne peuvent être réalisées que sur ces cellules, et il n'y a pas de méthode alternative pour répondre à ces questions. Nous avons choisi le modèle souris car il est difficile, pour des raisons éthiques et de disponibilité, d'expérimenter sur des ovocytes humains donnés à la recherche.

8025 Ce projet est pleinement intégré dans un consortium européen pour lequel des stocks de souches virales doivent être obtenus, permettant ainsi leur pérennisation, caractérisation (séquençage partiel ou complet du génome) et leur mise à disposition. En effet, l'émergence ou la réémergence d'épidémies virale nécessite de fournir à la communauté scientifique et hospitalière un panel de virus très large à partir desquels des outils diagnostics, préventifs ou curatifs pourront être développés. Actuellement, un certain nombre de virus d'intérêt ne sont pas cultivables ou très difficilement in vitro et il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour obtenir une quantité de virus suffisante nécessaire aux études biomédicales. L'inoculation intraventriculaire au souriceau nouveau-né est la seule technique expérimentale permettant la production de virus non cultivables ou difficilement cultivables. Les souriceaux seront surveillés 2 fois par jour et seront euthanasiés dès les premiers signes cliniques d'encéphalite liés à l'infection ou dès l'apparition de tout autre signe de souffrance (tremblements, prostration ou mise à l'écart du nid). Les conditions d'hébergement seront optimales en isocages ventilées enrichies (paper shaving pour nidification) dans un environnement calme, contrôlé (température, hygrométrie, luminosité) et sécurisé (laboratoire NSB3).

Un nombre maximal total de 225 femelles gestantes et 2250 souriceaux environ (10 souriceaux par portée en moyenne) sera utilisé sur 5 ans pour l'isolement de 15 souches de virus. Ce nombre a été rationalisé pour réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés en tenant compte de la technique de référence et des rendements de production nécessaire pour couvrir les besoins du projet.

8026 Notre groupe travaille sur la mise au point d'approches thérapeutique pour bloquer l'inflammation ou régénérer le cartilage détruit suite à des pathologies ostéo-articulaires notamment dans le cas de la polyarthrite rhumatoïde. Le blocage de l'inflammation associée à cette pathologie consiste à injecter des cellules « médicaments » qui vont libérer des molécules capables de réduire la réponse immunitaire.

L'objectif de ce projet est d'une part d'étudier le rôle joué par un sous-type particulier de cellules immunitaires dans l'arthrite et d'autre part d'évaluer la capacité des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à contrôler l'apparition et la fonction de ces cellules immunitaires afin de réduire les signes cliniques d'arthrite. Le modèle utilisé est le modèle d'arthrite induite au collagène (CIA), représentatif de la pathologie humaine. Le projet repose sur l'utilisation de CSM murines injectées en intraveineux. En parallèle, nous évaluerons les mécanismes moléculaires mis en place par ces cellules en utilisant des CSM déficientes pour l'expression de certains gènes et nous déterminerons l'impact de ces gènes sur l'effet thérapeutique des cellules.

Nous avons déterminé un programme de travail sur les 5 ans à venir qui tient compte des avancées attendues de notre projet de recherche. Cependant, le nombre d'animaux concerné par chaque procédure est certainement maximal (390 souris) et sera revu à la baisse si besoin pour tenir compte de la règle des 3R.

Toutes les dispositions seront prises pour respecter la règle des 3R :

- Réduction : le nombre d'animaux a été calculé avec l'aide d'un logiciel permettant d'évaluer le nombre d'animaux minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives sur les paramètres à mesurer (données préliminaires obtenues dans d'autres expériences réalisées au laboratoire)
- Raffinement : toutes les mesures seront prises pour réduire la souffrance des animaux. Le milieu d'hébergement sera enrichi (carrés de cellulose, copeaux de litière) et les animaux seront surveillés

quotidiennement. Les protocoles utilisés étant de degré de sévérité modéré au maximum, les animaux ne présentent pas de signes de souffrance habituellement. Cependant, dans le cas où certains signes seraient observés, un traitement oral avec du paracétamol serait mis en place

- Remplacement : Afin de proposer une thérapie cellulaire chez l'homme, il est important de démontrer l'efficacité thérapeutique des cellules souches mésenchymateuses dans un modèle préclinique pertinent chez l'animal (MSC murines dans modèle CIA souris). Des modèles in vitro ne suffisent pas seuls à évaluer l'efficacité de ces cellules ou des molécules ou des vésicules qui en dérivent.

8027 L'étude décrite dans le présent dossier sera réalisée dans le cadre d'une prestation contractuelle pour le compte d'un industriel qui développe des composés thérapeutiques dans le domaine des troubles métaboliques. L'étude visera à clarifier les mécanismes d'action par lesquels le composé X (dénomination confidentielle) exerce ses effets sur la régulation glycémique, la prise alimentaire et le poids corporel. L'hypothèse testée dans le présent paradigme consiste à vérifier que l'action du composé X puisse passer, en partie du moins, par une élévation des taux plasmatiques des corps cétoniques. La présente étude constitue une étape préliminaire consistant à suivre l'évolution des taux plasmatiques des corps cétoniques lors d'un traitement chronique à l'aide du composé X chez des rats sauvages (Sprague Dawley) et des rats diabétiques (ZDF), et ceci dans trois contextes d'alimentation différents : alimentation standard, alimentation de type "Western Diet" (45% de l'énergie apportée par les graisses) et alimentation cétogène (60% de l'énergie apportée par les graisses + enrichissement en cholestérol à 865 mg/Kg). Les traitements par le composé X seront administrés pendant 14 jours (D1-D15) via l'alimentation (composé X additionné à l'alimentation lors de la fabrication). La prise alimentaire individuelle et le poids corporel seront mesurés chaque jour pendant les 15 jours de traitement. Après 7 jours (D8) et 14 jours de traitement (D15) les taux plasmatiques en corps cétoniques seront mesurés chaque heure pendant 24h et la glycémie sera mesurée toutes les 2 heures. Afin de limiter au maximum le volume sanguin prélevé, les dosages seront réalisés par bandelettes sur une goutte de sang (5 microlitres environ) prélevée en bout de queue des animaux (volume total de prélèvement : environ 180 microlitres de sang). A l'issue du traitement, les animaux seront anesthésiés puis une ponction cardiaque sera réalisée avant euthanasie par administration d'Euthasol (pentobarbital sodique). Après euthanasie, le foie sera prélevé pour dosage du contenu en corps cétonique et en glycogène.

Un total de 120 rats sera utilisé dans le présent projet :

- 48 rats Sprague Dawley constitueront 6 groupes de 8 animaux (3 types d'aliments, traités par le composé X ou par le véhicule).

- 72 rats ZDF constitueront 6 groupes de 12 animaux (3 types d'aliments, traités par le composé X ou par le véhicule).

La règle des 3Rs a été prise en compte dans l'élaboration du présent protocole :

- Raffinement : Le modèle animal qui sera utilisé est un modèle parfaitement caractérisé dans la littérature et couramment utilisé dans les études précliniques cherchant à mettre en évidence les effets bénéfiques de composés sur la prise alimentaire, le poids corporel et les troubles métaboliques. Le protocole a été planifié de façon à limiter au maximum tout stress et tout inconfort pour les animaux. Les animaux seront hébergés en cages individuelles du fait de la nécessité de mesurer la prise alimentaire individuelle des animaux et les différentes cages seront positionnées de façon à ce que les animaux conservent un contact visuel et olfactif malgré l'isolement. Un enrichissement du milieu sera assuré par l'ajout d'igloos et de matériels de nidification. Enfin, un suivi journalier des animaux permettra une action rapide en cas d'atteinte des points limites établis.

- Réduction : Le nombre d'animaux utilisés a été rationalisé à partir de l'expérience acquise par notre laboratoire sur l'analyse des paramètres d'intérêt. Ainsi, le nombre d'animaux par groupe a été adapté en fonction des paramètres d'intérêt de façon à être en mesure de mettre en évidence une différence statistiquement significative sur les paramètres étudiés. La plus grande variabilité observée dans les paramètres d'intérêt chez les animaux ZDF comparativement aux animaux Sprague Dawley explique la différence d'effectif utilisée pour les deux modèles.

- Remplacement : L'utilisation d'animaux à des fins scientifiques se justifie ici car il n'existe aucune méthode de substitution n'utilisant pas l'animal de laboratoire et permettant l'étude de l'impact d'un composé sur le poids corporel, la prise alimentaire et les troubles métaboliques.

8028 Pour qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Ce projet regroupera des études testant les effets de divers principes actifs sur l'organisme. Le but de ce projet étant de détecter, via des études de pharmacocinétique et/ou pharmacodynamie, les principes actifs qui présentent des propriétés de candidats-médicaments. Ces produits pourront alors être promus pour la réalisation de dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et donc, la réalisation d'études précliniques réglementaires.

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie sont, par définition, l'étude de l'interaction entre l'organisme et un principe actif. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés : elles impliquent les grandes fonctions de l'organisme (dont le système circulatoire), de nombreux organes et tissus et sont fonction de l'état général de l'organisme dans son environnement. C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir accès à l'animal dans son entier, il n'est donc pas possible de le substituer par d'autres méthodes alternatives.

La souris et le rat seront les espèces utilisées dans ce projet. En effet, ce sont des mammifères dont l'anatomie et la physiologie sont proches de l'Homme et pour lesquelles de nombreuses données existent dans la Littérature. De plus, les rongeurs sont les espèces cibles réglementaires pour les premières études précliniques d'efficacité et de toxicité lors de la réalisation de dossier d'AMM de candidats médicaments. Les études réalisées dans ce projet permettront d'obtenir davantage de données pour ces espèces pour la recherche et à l'aboutissement de nouvelles thérapies.

Les études consisteront à administrer des produits à visée thérapeutique et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Pour raffiner le bien-être des animaux, une période d'acclimatation (>48h) sera réalisée à leur arrivée dans l'animalerie. Leur environnement sera adapté à leurs conditions de bien-être (température / lumière / hygrométrie, hébergement en groupe avec enrichissement) excepté si les objectifs de l'étude s'y opposent. Si les animaux n'ont pas été identifiés préalablement, ils le seront à leur arrivée en zone d'étude, selon les procédures en vigueur des lieux d'expérimentation (tatouage aux phalanges, poinçons et/ou encoches à l'oreille, marqueur sur la queue, puces).

Les techniques expérimentales pouvant engendrer du stress seront le plus possible limitées et feront l'objet d'une anesthésie si cela est nécessaire, en accord avec les recommandations éthiques internationales. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés tout au long des procédures pour anticiper toute dégradation de leur bien-être. Des mesures spécifiques seront prises le cas échéant, sur avis du vétérinaire référant si besoin (traitement/soins, enrichissement spécifique, etc.).

Pour éviter toute douleur et/ou souffrance inutile des animaux, des points limites généraux ont été définis et certains points limites spécifiques pourront être fixés au cas par cas en fonction des études et des modèles animaux.

Pour ce projet, les animaux pourront provenir d'élevages standards ou de lignées transgéniques avec ou sans phénotype dommageable. Dans ce dernier cas, des mesures spécifiques seront prises pour limiter les dommages du phénotype, en accord avec les recommandations éthiques internationales et les objectifs de l'étude.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque étude sera réduit au maximum tout en garantissant l'exploitabilité des résultats expérimentaux.

Basé sur nos prévisions d'études, nous estimons utiliser 240 animaux par an avec une répartition de 210 souris et 30 rats. Cela permettra d'évaluer environ 6 produits par an. 1200 animaux seront utilisés pour la totalité du projet.

8029 Les eaux marines côtières sont soumises à deux sources de variabilité physico-chimique, l'une naturelle (e.g. saisonnière, tidale, météorologique...) l'autre résultant des activités anthropiques (e.g.

eutrophisation, contamination, changements climatiques...). Ces sources de variabilité combinent leurs effets et affectent, de manière plus ou moins prévisible, les caractéristiques abiotiques (e.g. salinité, température, oxygénation) mais également biotiques (e.g. prédateurs, proies) de l'habitat des organismes marins. Face à cette variabilité environnementale, les poissons disposent de capacités d'ajustement importantes, tant physiologique, que morphologique, que comportementale, préservant ainsi leur capacité à exploiter les ressources présentes dans leur environnement. L'analyse de la littérature montre que les auteurs ont considérés la relation poisson-milieu essentiellement sous l'angle de la physiologie, laissant de côté les aspects morphologiques et comportementaux. L'objectif du présent travail vise à améliorer notre compréhension de la relation poisson-milieu en développant le volet comportemental.

Quelques soient les traits étudiés, qu'ils soient physiologiques, morphologiques ou comportementaux, on note généralement une forte variabilité interindividuelle au sein des populations de poissons. Cette diversité phénotypique est une des composantes de la résilience des populations à la variabilité environnementale. En effet, face à une même perturbation, un groupe d'individus est ainsi susceptible d'exprimer une large palette d'ajustements comportementaux, favorisant ainsi l'émergence d'une réponse adaptée garantissant la pérennité de la population. A titre d'exemple, des animaux téméraires vont plus profiter des opportunités (e.g. ressource alimentaire, abri, habitat) présentes dans leur environnement mais seront également plus sujet à la prédation. En revanche, les animaux moins téméraires profiteront moins des opportunités pouvant s'offrir mais seront également moins soumis à la prédation.

Les activités anthropiques sont à l'origine de nombreuses perturbations environnementales. Parmi celles-ci les rejets accidentels d'hydrocarbures ont des impacts qui restent mal évalués tant sur le plan économique qu'écologique. Chaque année plus d'un milliard de litres d'hydrocarbures sont rejetés dans les océans, majoritairement en relation avec la production de pétrole, son transport et son utilisation. De nombreuses études ont examinés les effets des hydrocarbures sur la physiologie des poissons. En revanche, très peu d'études ont examiné leurs effets sur les performances comportementales. Les quelques études disponibles suggèrent pourtant qu'une exposition à des hydrocarbures est susceptible d'altérer la capacité des animaux à percevoir les stimuli environnementaux affectant ainsi l'étendue de leur registre comportemental (e.g. distribution, migration, relation prédateur/proie). Parmi les comportements écologiquement importants, des études ont montré que le comportement social (sociabilité) présente une forte variabilité interindividuelle et semble être le trait de caractère le plus sensible aux variations environnementales ou à l'état physiologique (e.g. jeûne). La sociabilité est particulièrement pertinente chez notre modèle biologique (*Dicentrarchus labrax*), les juvéniles de cette espèce vivant en groupe.

En cas d'une marée noire, une des stratégies de réponse est l'utilisation de dispersants chimiques pour le traitement de la zone touchée. Mais les répercussions d'un tel traitement ne sont pas encore bien évaluées, cela pourrait notamment augmenter la biodisponibilité du pétrole. Aussi leur utilisation reste controversée.

Une étude précédente a permis de mettre en évidence un effet de léthargie et une altération de la perception du risque chez des juvéniles de bar suite à une exposition à des hydrocarbures pétroliers dispersés chimiquement. Aussi, un rétablissement de ces comportements a été observé en moins de deux semaines post-exposition. Il semble maintenant pertinent de regarder à la fois si ces observations sont confirmées au niveau d'un groupe d'individus et si la récupération au niveau comportementale s'inscrit dans la même échelle de temps que la récupération au niveau physiologique. En effet, aucune étude à notre connaissance n'a évalué en parallèle la récupération des capacités physiologiques et comportementales. Pourtant il est intéressant de savoir si la détoxification suite à une telle exposition permet la récupération sur une même échelle de temps de ces deux traits caractéristiques du bien-être des animaux.

Dans ce contexte, la présente demande d'autorisation de projet a pour objectif, d'évaluer l'impact d'une exposition à des hydrocarbures pétroliers traités chimiquement avec un dispersant sur : la sociabilité; la réponse d'un groupe d'individus à la simulation d'une attaque de prédateur et un paramètre physiologique témoin des capacités de l'animal, le taux métabolique (mesure de consommation d'oxygène par respirométrie) suite à la simulation d'une attaque de prédateur.

Le modèle choisi dans cette étude est le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), une espèce importante tant en termes écologique qu'économique.

Cette étude, fait l'objet d'une autre demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques puisqu'elle comprend deux étapes se déroulant dans deux établissements utilisateurs distincts. La première étape qui est l'objet de la présente demande d'autorisation de projet, consiste à exposer les poissons au traitement expérimental : pétrole + du dispersant, dans un établissement possédant des installations expérimentales appropriées. La seconde étape, qui fait l'objet de l'autre d'autorisation de projet, est réalisée après transfert des animaux dans le second établissement utilisateur et elle porte sur le suivi temporel des réponses comportementales et physiologique des individus sur une période de 8 jours suivant l'exposition au traitement.

Le projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans une étude dont le but est l'analyse de l'expression des traits comportementaux et physiologiques, ce qui implique l'utilisation d'animaux vivants (Remplacement). Le projet mobilisera 304 poissons. Le nombre de poissons a été déterminé par des calculs de puissance statistique reposant sur la mise en œuvre d'analyses de variance. Ce nombre est optimisé afin de permettre la prise en compte de l'étendue de la variabilité interindividuelle naturelle (Réduire), tout en tenant compte des contraintes zootechniques telles que la densité minimale d'animaux requise en élevage pour ne pas induire de perturbations comportementales (Raffiner).

8030 Les maladies du système nerveux (Parkinson, Alzheimer, Huntington...) sont une préoccupation croissante en santé publique. De nouveaux outils diagnostiques associés à de nouvelles stratégies thérapeutiques sont nécessaires pour améliorer la prise en charge des patients. Les modèles animaux sont des outils précieux et pertinents dans le développement de nouvelles approches diagnostiques et thérapeutiques.

La maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative incurable qui entraîne la perte progressive et irréversible des fonctions mentales, et notamment de la mémoire. Ses symptômes sont liés à des altérations du fonctionnement de l'activité des synapses, ces zones qui permettent la communication entre les neurones. Les travaux menés depuis dix ans ont montré que des cellules du système nerveux appelées astrocytes contribuent significativement à l'activité des synapses. Ce projet, primé par la Fondation de France et France Alzheimer et impliquant trois équipes de recherche françaises, a pour objectif de déterminer, à l'aide de nouvelles approches expérimentales encore jamais utilisées dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, le rôle de ces astrocytes dans un modèle rongeur de la maladie. Ce modèle animal est indispensable pour l'étude de ces synapses complexes dans un environnement pathologique pertinent, encore aujourd'hui trop imparfaitement modélisé in vitro.

Pour mener à bien ce projet, plusieurs expertises (in vivo, ex vivo, imageries cellulaires...) seront combinées. Les chercheurs testeront de nouveaux axes thérapeutiques visant à restaurer des fonctions vitales normalement assurées par les astrocytes par thérapie génique utilisant des vecteurs viraux (AAVs) et à en évaluer l'efficacité grâce à la mise en œuvre d'études précliniques.

Les animaux étudiés dans le cadre de ce projet, provenant d'élevage reconnus, sont nés et élevés en captivité. Leur nombre a été ramené au minimum (332 animaux) nécessaire pour d'obtenir des données statistiquement suffisantes afin de répondre aux questions scientifiques posées.

L'évaluation fonctionnelle sera menée en utilisant des techniques non-invasives telles que l'imagerie IRM. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie des procédures chirurgicales ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. Des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêts permettent de veiller au bien-être des animaux.

8031 Le syndrome de Dravet est une épilepsie sévère débutant dans l'enfance avec des crises épileptiques pharmacorésistantes persistantes toute la vie. Cette épilepsie a une origine génétique avec une mutation du gène SCN1A dans 80% des cas. Chez ces patients, la vaccination et la fièvre sont des facteurs favorisant la survenue de crises épileptiques et de crises épileptiques prolongées. Il a été montré récemment que les macrophages circulants de patients atteints de syndrome de Dravet ont un phénotype pro inflammatoire (type M1 (augmentation des cytokines pro inflammatoires IL-1b, IL-6

et TNF α et baisse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10)). Cet état pro inflammatoire pourrait contribuer à la survenue, la répétition et la résistance aux traitements des crises épileptiques dans cette maladie.

Nous voulons savoir si les modifications pro inflammatoires des macrophages (cellules de l'immunité circulant dans le sang) s'observent aussi dans la microglie (cellules de l'immunité au niveau du cerveau).

Pour cela nous allons utiliser un modèle murin de syndrome de Dravet disponible (B6(Cg)-Scn1atm1.1Dsf/J). Dans ce modèle, le phénotype est modéré avec peu de crises épileptiques et des modifications comportementales.

Notre étude comparera les cellules microgliales avec ou sans stimulation de l'immunité par l'injection de LPS (lipopolysaccharide).

Nous tenons compte des 3R dans ce projet avec un nombre minimum d'animaux nécessaire à cette étude exploratoire. Il n'y a pas d'autre modèle de syndrome de Dravet et l'exploration humaine n'est pas possible. Notre exploration portera sur les composantes inflammatoires après une simple injection de LPS. Nous n'envisageons pas à ce stade de voir si le phénotype est modifié (Raffinement en évitant des procédures plus lourdes d'exploration de l'épilepsie et du comportement). Seule la preuve de modification inflammatoire conduira à une nouvelle étude avec évaluation du phénotype épileptique et comportemental.

Ce projet utilisera 4 groupes de 15 souris sur 1 an. Soit un total de 60 souris (30 C57Black6 et 30 B6(Cg)-Scn1atm1.1Dsf/J). 4 groupes seront constitués : Souris C57 avec injection de solution saline isotonique, souris C57 avec injection de LPS, Souris Dravet avec injection de solution saline et Souris Dravet avec injection de LPS.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires dans le syndrome de Dravet. Cela permettra d'envisager des pistes pour de nouveaux traitements de cette maladie.

8032 Pour qu'un nouveau composé devienne un médicament sûr et efficace, un ensemble d'études expérimentales utilisant des animaux est nécessaire. Ce projet regroupera des études testant les effets de divers principes actifs sur l'organisme. Le but de ce projet étant de détecter, via des études de pharmacocinétique et/ou pharmacodynamie, les principes actifs qui présentent des propriétés de candidats-médicaments. Ces produits pourront alors être promus pour la réalisation de dossier d'Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et donc, la réalisation d'études précliniques réglementaires.

La pharmacocinétique et la pharmacodynamie sont, par définition, l'étude de l'interaction entre l'organisme et un principe actif. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés : elles impliquent les grandes fonctions de l'organisme (dont le système circulatoire), de nombreux organes et tissus et sont fonction de l'état général de l'organisme dans son environnement. C'est pourquoi, il est nécessaire d'avoir accès à l'animal dans son entier, il n'est donc pas possible de le substituer par d'autres méthodes alternatives.

La souris et le rat seront les espèces utilisées dans ce projet. En effet, ce sont des mammifères dont l'anatomie et la physiologie sont proches de l'Homme et pour lesquelles de nombreuses données existent dans la Littérature. De plus, les rongeurs sont les espèces cibles réglementaires pour les premières études précliniques d'efficacité et de toxicité lors de la réalisation de dossier d'AMM de candidats médicaments. Les études réalisées dans ce projet permettront d'obtenir davantage de données pour ces espèces pour la recherche et à l'aboutissement de nouvelles thérapies.

Les études consisteront à administrer des produits à visée thérapeutique et à surveiller pendant une période définie l'apparition d'anomalies cliniques ou physiologiques, puis à mettre à mort les animaux si des études post mortem sont nécessaires.

Pour raffiner le bien-être des animaux, une période d'acclimatation (>48h) sera réalisée à leur arrivée dans l'animalerie. Leur environnement sera adapté à leurs conditions de bien-être (température / lumière / hygrométrie, hébergement en groupe avec enrichissement) excepté si les objectifs de l'étude s'y opposent. Si les animaux n'ont pas été identifiés préalablement, ils le seront à leur arrivée en zone

d'étude, selon les procédures en vigueur des lieux d'expérimentation (tatouage aux phalanges, poinçons et/ou encoches à l'oreille, marqueur sur la queue, puces).

Les techniques expérimentales pouvant engendrer du stress seront le plus possible limitées et feront l'objet d'une anesthésie si cela est nécessaire, en accord avec les recommandations éthiques internationales. Les animaux seront observés quotidiennement et pesés tout au long des procédures pour anticiper toute dégradation de leur bien-être. Des mesures spécifiques seront prises le cas échéant, sur avis du vétérinaire référant si besoin (traitement/soins, enrichissement spécifique, etc.).

Pour éviter toute douleur et/ou souffrance inutile des animaux, des points limites généraux ont été définis et certains points limites spécifiques pourront être fixés au cas par cas en fonction des études et des modèles animaux.

Pour ce projet, les animaux pourront provenir d'élevages standards ou de lignées transgéniques avec ou sans phénotype dommageable. Dans ce dernier cas, des mesures spécifiques seront prises pour limiter les dommages du phénotype, en accord avec les recommandations éthiques internationales et les objectifs de l'étude.

Le nombre d'animaux utilisé pour chaque étude sera réduit au maximum tout en garantissant l'exploitabilité des résultats expérimentaux.

Basé sur nos prévisions d'études, nous estimons utiliser 700 animaux par an avec une répartition de 600 souris et 100 rats. Cela permettra d'évaluer environ une quinzaine de produits par an. 3500 animaux (3000 souris et 500 rats) seront utilisés pour la totalité du projet.

8033 30% des patients admis en réanimation présentent une infection sévère d'origine bactérienne (sepsis). Parmi ces patients le taux de mortalité est élevé. Aucun traitement n'est actuellement disponible pour traiter un sepsis. Lors d'une infection bactérienne, l'initiation de la réponse défensive débute par la reconnaissance de la bactérie par des cellules immunitaires appelées macrophages, dont il existe une grande variété. Cette reconnaissance passe par une cascade de réactions et la production de certains facteurs inflammatoires dont les cytokines.

Indépendamment du sepsis, l'activité physique permet une amélioration de la réponse des macrophages face aux bactéries (modification des différents types de populations des macrophages, amélioration de la fonction macrophagique).

L'objectif de l'équipe est d'évaluer l'effet de l'exercice physique sur l'activation et la modulation de la réponse inflammatoire dans le cadre du sepsis. L'hypothèse est que l'exercice physique induirait une réponse inflammatoire plus précoce et efficace via son action sur les macrophages ce qui permettrait d'améliorer le pronostic des patients. Le présent projet permettra de déterminer si un exercice préalable à l'induction d'un sepsis modifie la survie des individus et comment il module la réponse inflammatoire associée (cytokines, fonctions et population des macrophages).

Pour cela, 3 conditions expérimentales sont définies :

Groupe ES : réalisation d'un exercice (procédure 1) avant induction du sepsis (procédure 2)

Groupe S : induction du sepsis sans exercice préalable (procédure 2)

Groupe E : réalisation d'un exercice (procédure 1) sans induction de sepsis

Afin de valider l'hypothèse, 940 souris, réparties en 4 lots seront nécessaires :

Lot1 (116 animaux) : Comparaison des courbes de survie entre les groupes ES et S.

Lot2 (384 animaux) : Corrélation entre courbe de survie et cinétique du syndrome inflammatoire, comparaison des 3 groupes ES, S et E.

Lot3 (220 animaux) : Caractérisation des sous populations des macrophages sanguins et pulmonaires à différents temps après induction du sepsis entre les groupes ES et S.

Lot4 (220 animaux) : Etude de la fonction des macrophages sanguins et pulmonaires à différents temps après induction du sepsis entre les groupes ES et S.

Les procédures sont établies dans le respect de la règle des 3R.

Réduction : Le nombre d'animaux a été optimisé afin de le limiter au maximum tout en s'assurant que les effectifs seront suffisants pour valider les hypothèses formulées.

Remplacement : Les mécanismes physiopathologiques impliqués lors de l'exercice physique et du sepsis mettent en jeu des mécanismes intégratifs complexes. Ils nécessitent l'utilisation de l'animal au stade des connaissances actuelles. Dans ce cadre-là, le remplacement est impossible.

Raffinement : Toutes les mesures ont été prises pour limiter au maximum la souffrance de l'animal et respecter son bien-être. Ainsi, nous utilisons un score (M-CASS) qui évalue cliniquement l'état de santé de l'animal. Le résultat de ce score permet d'adapter la prise en charge antalgique. Par ailleurs, lors de leur stabulation, les animaux sont hébergés dans des conditions appropriées à leur espèce, avec enrichissement du milieu et visite au minimum quotidienne et autant que nécessaire suite à l'évaluation clinique M-CASS.

8034 L'épilepsie est un trouble neurologique majeur qui touche 65 millions de personnes dans le monde et 30% des patients épileptiques souffrent de crises résistantes aux médicaments. En particulier, l'épilepsie mésiotemporale (MTLE) est la forme la plus courante des épilepsies réfractaires et se caractérise par la récurrence de crises spontanées. Cette épilepsie est initiée par un traumatisme initial (ex : convulsions fébriles) survenant dans la petite enfance, qui est ensuite suivi d'une période de latence de plusieurs années avant l'apparition des crises. Cette période de latence correspond au développement progressif de l'épilepsie, un processus appelé épileptogenèse. La pharmacorésistance de cette pathologie crée un réel besoin de trouver de nouvelles thérapies visant à prévenir l'épileptogenèse et/ou supprimer les crises durant la phase chronique de la maladie. Sur le plan histologique, le développement de l'épilepsie est associé à un remaniement profond des circuits qui connectent les cellules nerveuses (neurones), qui est responsable de la mise en place des crises. A ce jour, les modifications de ces réseaux restent incomprises. Aussi, ce projet a pour but d'étudier les modifications des réseaux de neurones responsables des crises. Ceci est une étape indispensable à la mise en place de nouvelles thérapeutiques visant à empêcher ces remaniements et bloquer les crises.

La compréhension des mécanismes sous-jacents de la MTLE et le développement de thérapies nécessitent l'utilisation de modèles animaux présentant des crises spontanées chroniques. Il n'existe à ce jour aucun modèle cellulaire permettant de reproduire l'épilepsie in vitro. Nous avons développé et utilisé avec succès au cours des 15 dernières années un modèle chronique de MTLE obtenu chez la souris adulte par une micro-injection intracérébrale de kainate (analogue du glutamate induisant une excitotoxicité) dans l'hippocampe. Ce modèle constitue le modèle animal le plus adapté car il mime la plupart des caractéristiques histopathologiques, électrophysiologiques, comportementales et pharmacologiques de la MTLE humaine. Ce modèle animal a été validé précédemment dans de nombreuses autorisations à projet en expérimentation animale.

Dans ce projet de recherche fondamentale et translationnelle, nous utiliserons ce modèle d'épilepsie pour caractériser les circuits de neurones responsables des crises. Il est important de rappeler que la MTLE ne s'accompagne pas de douleur particulière chez l'homme ou les souris. Les animaux recevront des injections intracérébrales de vecteurs viraux pour visualiser les neurones. Ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur/souffrance/angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur/souffrance/angoisse. A la fin du projet, tous les animaux seront euthanasiés pour permettre l'analyse histologique de leur cerveau. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude a été réduit au minimum, sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons. Nous estimons qu'un nombre minimum de 648 souris sera nécessaire pour accomplir ce projet sur une durée de 5 ans sans compromettre la validité statistique des expériences.

Les résultats obtenus permettront de comprendre la source des crises d'épilepsie mésiotemporale. En particulier, grâce à un modèle animal prédictif, les résultats obtenus seront d'une grande pertinence à l'égard de la pathologie humaine.

8035 L'apprentissage des gestes de base ou technique en anesthésiologie peut s'effectuer la plupart du temps sur mannequin ou simulateur. Cependant deux situations nous amènent à devoir utiliser l'animal vivant pour cet apprentissage :

1) Apprentissage des techniques d'anesthésie animale.

Cette formation s'adresse à tout le personnel souhaitant maîtriser les techniques d'anesthésie, perfusion, intubation sur le rat, la souris, le lapin et le porc dans le cadre de leur formation de concepteur, d'expérimentateur ou encore les formations de maintien à niveau.

Utilité et nécessité des expériences sur l'animal :

La démonstration des modifications physiopathologiques dues à l'anesthésie, abordées lors des cours théoriques, ne peut se passer de leur visualisation sur des appareils de monitoring utilisés lors des anesthésies.

Les gestes enseignés, tels que la mise en place de voies veineuses périphériques ou l'intubation endotrachéale, ne peuvent s'acquérir que par des manipulations sur animaux vivants et anesthésiés.

L'acquisition des bonnes pratiques d'anesthésie pour les animaux utilisés en expérimentation permet :

- De diminuer la mortalité per- et post-opératoire
- De réduire ainsi le nombre d'animaux utilisés
- D'éviter des souffrances associées aux manipulations
- D'obtenir des résultats reproductibles et interprétables

Justification du choix de l'espèce, et du modèle :

- le porc, de plus en plus fréquemment utilisé en expérimentation, est un animal dont l'anatomie, ainsi que les caractéristiques physiologiques sont suffisamment proches de l'humain pour constituer un modèle de choix. C'est un animal de grande taille, et grâce à cette caractéristique, les modifications enregistrées par les appareils de monitoring sont parfaitement compréhensibles.

- Le lapin, souvent utilisé pour les expérimentations de la sphère ophtalmique, présente des caractéristiques anatomiques particulières rendant son intubation endotrachéale particulièrement difficile, la démonstration et l'enseignement de ce geste « in vivo » est absolument nécessaire à l'acquisition de cette technique qui permet le contrôle des voies aériennes supérieures et évite la réalisation d'une trachéotomie.

- Les rongeurs, rats et souris, bénéficient des progrès de l'anesthésie et des techniques nouvelles doivent être démontrées afin d'apprécier la faisabilité de certains gestes essentiels (intubation endotrachéale, ventilation artificielle, monitoring)

2) Apprentissage des gestes d'anesthésie technique chez l'homme :

Cette formation s'adresse aux médecins anesthésiste qui souhaitent maîtriser de nouvelles compétences très spécialisée et/ou qui souhaitent introduire en pratique courante un nouveau dispositif. Dans ce contexte, les formateurs sont confrontés à l'absence de simulateurs assez avancés pour assurer un degré de réalisme suffisant. L'apprentissage directement sur le terrain, en autres termes sur l'homme, n'est pas acceptable.

Remplacement : Il n'existe aujourd'hui aucun moyen autre que l'expérimentation sur animal vivant pour l'apprentissage réaliste de certaines procédures techniques avancées d'anesthésie et réanimation. Les animaux susceptibles de servir comme modèles d'entraînement, dans le contexte des cours envisagés, sont en particulier : le porc, le lapin, les rongeurs.

Ces mammifères ont en commun avec l'homme la physiologie et l'anatomie cardio-respiratoire, permettant l'évaluation des techniques d'intubation, de ventilation, etc. Le porc, en particulier, par sa grande taille offre l'opportunité d'utiliser exactement les mêmes dispositifs et techniques utilisés chez l'homme.

Réduction : le nombre des animaux utilisés durant les travaux pratiques est réduit au minimum. Plusieurs participants, à tour de rôle, utiliseront le même sujet d'expérimentation afin d'apprendre une technique. Au total, durant les 5 ans de durée de ce projet, nous estimons utiliser :

10 lapins (2 par an), utilisés dans le cadre de la formation Anesthésiologie appliquée à l'expérimentation (concepteur) (Equivalent Niveau 1, durée 3 jours),

15 rats (3 par an), utilisés dans le cadre de la formation Anesthésiologie appliquée à l'expérimentation (concepteur) (Equivalent Niveau 1, durée 3 jours),

80 porcs (16 par an), utilisés dans le cadre de 2 cours :

1) le module Anesthésiologie de la Formation à l'Expérimentation Animale (Expérimentateur durée 1 jour), (2 porcs par an)

2) le module Anesthésiologie de la Formation Concepteur (4 porcs par session)

3) Le cours « Respiration, Anesthesia and Intensive Care » (10 porcs par an).

Raffinement : il est prévu que toutes les procédures soient effectuées sous anesthésie générale et avec un contrôle de la douleur pendant l'expérimentation. Le protocole d'anesthésie fait appel aux techniques de suivis anesthésiques les plus performantes. Les procédures expérimentales seront réalisées par du personnel qualifié et expérimenté (vétérinaires, chirurgiens, anesthésistes et techniciens animaliers) afin d'optimiser tous les gestes invasifs et réduire le temps interventionnel ainsi que le nombre d'animaux nécessaires. Pour améliorer le bien-être de nos animaux avant et lors de nos interventions, nous prenons soin de leur fournir un environnement adapté.

8036 Notre laboratoire s'intéresse aux lymphomes, des maladies qui se développent à partir des lymphocytes B : cellules du sang qui ont perdu leur capacité à devenir des cellules appelées plasmocytes et dont le rôle est de protéger l'organisme contre les infections par des agents extérieurs. Leur incidence est en constante augmentation et ces maladies restent incurables en dépit de nouvelles thérapeutiques. Notre projet de recherche vise à identifier les étapes critiques et les molécules clefs qui régissent le destin (la différenciation) du lymphocyte B jusqu'au plasmocyte et qui pourraient contribuer au développement ou au maintien de ces lymphomes. Les travaux du laboratoire ont démontré l'importance de molécules, l'interleukine 2 (IL-2) et l'IL-15, dans ce processus par des études menées hors de l'organisme (in vitro). Cependant cela ne permet pas de déterminer quand et comment ces molécules agissent au sein des organes lymphoïdes secondaires où se déroule la différenciation des lymphocytes B. A l'heure actuelle il n'existe pas d'étude menée chez l'animal démontrant leur rôle dans la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes. Notre objectif est d'étudier le rôle de l'IL-2 et l'IL-15 chez des souris modifiées dans lesquelles les lymphocytes B sont insensibles à ces molécules (souris déficientes pour le gène *Il2rb*). Pour cela nous immuniserons ces souris selon différents protocoles. Cela consiste à introduire dans l'organisme un agent (petites molécule, bactéries) dépourvues de pathogénicité (incapable de rendre malade) mais capable d'induire une réponse immunitaire en induisant la différenciation des lymphocytes B en plasmocytes capables de produire des anticorps qui reconnaissent et neutralisent l'agent étranger. Cela nous permettra d'évaluer le rôle de l'IL-2 et IL-15 dans la différenciation des lymphocytes B. Ce projet fera avancer les connaissances fondamentales sur la différenciation plasmocytaire normale, étape indispensable à la compréhension des mécanismes à l'origine d'immunodéficiences et de cancers.

Les procédures décrites prévoient l'utilisation de 640 souris, en adéquation avec la règle des 3 Rs :

Remplacer : Les précédents travaux de notre équipe se sont attachés à comprendre les rôles de l'IL-2 et IL-15 dans un modèle d'étude qui ne nécessitait pas d'expérimentation animale (modèles cellulaires in vitro). Cependant ces modèles ne peuvent pas se substituer efficacement aux analyses menées sur l'animal car elles ne prennent pas en compte la complexité des organes lymphoïdes secondaires où se produit la réponse immunitaire.

Réduire : Dans l'intérêt de réduire le nombre d'animaux utilisé, les expérimentations ont été mises en place de manière à utiliser le moins de souris possible, en extrayant le plus d'informations, notamment en utilisant plusieurs organes (moelle osseuse, ganglions, rate et sang) pour réaliser les différentes analyses sur un même animal. Enfin les protocoles d'immunisations seront réalisés successivement afin de définir les meilleures conditions expérimentales pour notre étude et uniquement si les résultats obtenus justifient de réaliser un autre type d'immunisation.

Raffiner : Toutes les lignées de souris déjà existantes n'induisent pas de phénotype douloureux. La littérature décrit les protocoles d'immunisation spécifiques aux agents immunogènes qui seront

appliqués dans cette étude. Les animaux seront surveillés après immunisation pour détecter l'apparition d'une éventuelle douleur et l'inconfort provoqué sera soulagé. De plus les animaux sont élevés dans des conditions adaptées : locaux confinés, portoirs ventilés, eau et nourriture ad libitum, maximum 5 animaux/cage et aucun animal ne sera maintenu seul dans sa cage.

8037 Depuis le début des années 1980, le nombre de transplantations pulmonaires est en constante augmentation, or la progression quantitative et qualitative de la greffe pulmonaire au cours des trente dernières années masque un problème crucial de pénurie d'organes. Le développement de nouvelles stratégies d'évaluation des greffons permettrait d'augmenter le nombre d'organes disponibles en en requalifiant un certain nombre pour la greffe, suite à une évaluation plus pertinente de leur viabilité.

Dans ce contexte, la finalité du projet proposé est d'étudier l'amélioration de la viabilité de greffons pulmonaires initialement récusés selon les critères internationaux, par reperfusion-reventilation "ex vivo" de ces greffons. Pour améliorer les procédures actuelles, nous souhaitons caractériser de nouveaux biomarqueurs volatiles, disponibles en temps réel et non invasifs, afin de faciliter la sélection des greffons pulmonaires à transplanter. Secondairement, la viabilité des greffons pourrait être améliorée par l'utilisation de thérapeutiques réduisant les lésions d'ischémie-reperfusion.

L'application clinique visée justifie le recours à des organes prélevés sur des animaux et il ne nous est pas possible d'utiliser un autre modèle expérimental. Notre expérimentation sera ainsi réalisée sur sept jeunes porcs anesthésiés, puis euthanasiés, sur lesquels seront prélevés les poumons à qualifier comme greffons pulmonaires. Dans le respect de la règle des 3R, l'effectif des animaux utilisés est limité au strict nécessaire permettant une exploitation statistique robuste de nos résultats scientifiques. Tout au long de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être de ces porcs qui seront hébergés en groupes sociaux de 2 ou 3 animaux dans un environnement enrichi adapté aux besoins de cette espèce. L'état de santé des porcs sera suivi quotidiennement afin de vérifier l'absence de souffrance des animaux. Lors de l'expérimentation, l'anesthésie des animaux, associée à une prémédication, permettra d'éviter tout stress et toute souffrance jusqu'à leur décès, induit sans reprise de conscience.

8038 Les réponses immunitaires antibactériennes mettent en jeu des mécanismes cellulaires et moléculaires divers visant d'une part à éliminer les agents bactériens et dans un second temps à prémunir l'organisme contre une seconde réinfection.

Cependant, et alors qu'ils sont efficaces dans l'élimination des bactéries, ces mécanismes peuvent également s'avérer délétères s'ils ne sont pas correctement régulés par l'organisme. Ainsi, des syndromes inflammatoires ont été observés secondairement à certaines infections bactériennes alors même que celles-ci ont été éliminées par l'organisme. Ces inflammations si elles ne sont pas correctement traitées pourraient être à l'origine de maladies chroniques telles que des maladies auto-immunes, des syndromes inflammatoires ou des cancers.

A l'origine de ces réactions inflammatoires secondaires aux infections pourrait être impliquée une réaction immunitaire trop forte car mal ou insuffisamment régulée. Or les mécanismes de régulation de la réponse antibactérienne restent à élucider. Une meilleure connaissance de ces mécanismes devrait donc permettre de traiter voire d'anticiper les réactions inflammatoires importantes suite à des infections bactériennes.

Dans ce contexte, ce projet vise à disséquer les mécanismes de contrôle de la production d'IFN γ , l'un des facteurs essentiels à la réponse antibactérienne, et qui en parallèle a été identifié comme l'un des médiateurs principaux des pathologies inflammatoires secondaires.

Dans ce contexte, nous proposons d'étudier comment la production d'IFN γ par les lymphocytes T CD8 mémoire, l'une des sources principales de cette cytokine, lors d'une infection par *Salmonella Typhimurium*.

Ces mécanismes de régulation mettant très probablement en jeu de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires, nous avons choisi de les étudier in vivo chez la souris pour laquelle cette infection bactérienne a été bien caractérisée.

Toutes les expériences décrites dans ce projet seront réalisées dans le respect de la règle des 3 R, remplacement, réduction et raffinement.

Des expériences préliminaires antérieures nous ont permis de mettre au point des modèles d'étude d'infection par une souche atténuée de *Salmonella Typhimurium*. Nous avons pu ainsi établir des procédures visant à réduire au maximum et les effets délétères de l'infection, et les nombre d'animaux pour chaque expérience, tout en optimisant statistiquement les résultats attendus (environ 800 animaux sur 18 mois). Toutes les procédures expérimentales, qui présentent à priori un degré de sévérité de classe modérée du fait de l'atténuation de la souche bactérienne utilisée, et des points limites qui ont été définis, seront réalisées de manière à limiter au maximum l'inconfort et la souffrance des animaux.

En permettant de mieux comprendre les processus de régulations de l'IFN γ , ce projet devrait permettre la mise au point de stratégies thérapeutiques afin de limiter les conséquences inflammatoires de certaines infections bactériennes, et d'éviter le développement de pathologies chroniques plus sévères, comme les pathologies auto-immunes ou les cancers.

8039 Le cancer du sein est la 2ème cause de cancer en général et la première cause de cancer chez la femme. Parmi les femmes atteintes du cancer au sein et initialement sans métastase, 20% récidiveront avec métastases dans les 5 ans Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats histologiques obtenus au niveau de la tumeur primaire. Cependant les cellules constituant les métastases peuvent être différentes de celles de la tumeur primaire. Il serait donc primordial de pouvoir caractériser, à priori, les différentes métastases, c'est-à-dire de les phénotyper pour effectuer ensuite une thérapie ciblée. Dans ce cadre, l'objectif de la médecine nucléaire est donc de développer les meilleurs radiomarqueurs pour le diagnostic et la radiothérapie interne vectorisée (RIV) des métastases du cancer du sein et une des cibles proposées pour ce projet est l'intégrine α V β 3. L'intégrine α V β 3 joue un rôle prépondérant dans l'angiogenèse, la prolifération et la dissémination des métastases tumorales. Elle est surexprimée par les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux et des cellules de nombreux cancers, entre autre le cancer du sein.

Nous disposons de deux molécules ciblant cette intégrine α V β 3. L'objectif est de déterminer quelle est celle qui possède les propriétés plus intéressantes pour une approche diagnostique (dans ce cas la molécule est marquée au Gallium-68, un émetteur de rayon gamma adapté à l'imagerie) et pour une approche thérapeutique (la même molécule est alors marquée au Lutétium-177, un émetteur de rayon beta adapté à la radiothérapie). Nous effectuerons une étude pilote sur des petits effectifs pour observer la biodistribution de ces deux molécules sur des souris non porteuses de tumeurs (CD1), avant de mettre au point le modèle d'implantation tumorale (cellules issues de glioblastome – α V β 3+) sur des souris Swiss nudes. Ensuite, l'étude de la biodistribution sera faite sur le modèle tumoral avec les molécules marquées au Gallium-68 pour un seul temps car sa courte demie vie (68min) ne permet pas de réaliser des études à temps longs, puis au Lutetium-177 (à une dose faible donc non thérapeutique) car sa longue demie vie (6.7 jours) permettra d'évaluer la biodistribution sur 6 temps (de 1 h à 1 semaine post-injection). L'efficacité thérapeutique sera évaluée sur le même modèle animal en utilisant là encore les molécules marquées au 177Lu mais à une dose plus importante que précédemment afin de réaliser une radiothérapie interne. L'étude comprendra ainsi au total 176 animaux. Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : L'évaluation in vivo chez l'animal des nouveaux radiopharmaceutiques est indispensable. Elle constitue la dernière étape de leur validation, préalable à leur passage vers les études de toxicologie et les phases cliniques. Les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie ; des points limite adaptés, tel qu'un volume tumoral maximal, seront utilisés afin de réduire le stress et la souffrance ; un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé ; enfin, le nombre minimum de mesures et d'animaux permettant le recueil de données statistiquement exploitables sera utilisé.

8040 L'embolisation (occlusion endovasculaire) de la veine porte du foie est une technique bien établie, dont le but est d'induire une hypertrophie hépatique, avant une résection majeure du foie. On diminue ainsi le risque d'insuffisance hépatique post-résection (la fonction globale du foie dépend fortement du volume restant). Jusqu'à présent, seule l'embolisation d'une moitié du foie a été décrite et

formellement utilisée de manière standardisée. Bien que largement implémentée, son effet est cependant limité en termes de gain fonctionnel. Il en résulte une limitation du volume de foie pouvant être enlevé. A notre avis, des améliorations peuvent être apportées à la technique actuelle, en particulier son extension au-delà d'une moitié du foie, et donc induire encore plus d'hypertrophie et étendre les possibilités de résection.

La faisabilité technique d'une embolisation portale subtotale en deux temps dans le modèle porcin a été démontrée dans la première partie de notre protocole (en cours de publication). Cette procédure est bien tolérée par l'animal et induit une hypertrophie (gain en volume) très importante, de l'ordre de +160%. Il n'est pas clair si cette augmentation est suivie d'une amélioration de la fonction aussi importante.

L'objectif de la phase 2 du protocole est donc de démontrer que l'embolisation subtotale du foie permet d'obtenir un gain en fonction tout aussi important, compatible avec une résection extrême du foie (hépatectomie subtotale), normalement impossible à réaliser.

Une étude randomisée et contrôlée sera effectuée. Le groupe contrôle (5 cochons) comprenant une embolisation portale gauche seule sera comparé à un groupe expérimental (5 cochons) ayant bénéficié d'une embolisation subtotale (gauche + segmentaire droite). Après deux semaines, une hépatectomie subtotale (tout le foie sauf un seul segment) sera effectuée dans les deux groupes. Normalement, ce type d'intervention est invariablement suivi d'une insuffisance hépatique par manque de parenchyme restant. Nous prévoyons que ce type de complication ne sera pas rencontré dans le groupe expérimental.

Tout le processus (embolisation + hépatectomie) requiert un protocole précis et complexe à coordonner. Une phase de test sera effectuée avant le début de la randomisation, sur deux cochons tests, sans phase de survie post-opératoire.

Ce projet remplit les conditions des 3R :

- Remplacement : Les techniques radiologiques appliquées présentent des effets (bénéfiques ou délétères) inconnus. Le recours à l'animal est donc nécessaire. Le modèle porcin est idéal, car il présente une anatomie hépatique favorable, proche de l'Humain et une taille permettant d'effectuer ces interventions par voie endovasculaire.
- Réduction : 2 animaux sans survie nous permettront de parfaire la séquence nécessaire. Par la suite, 10 cochons seront inclus dans la phase randomisée, répartis en deux groupes. Aucune donnée n'est disponible dans la littérature permettant de calculer une taille d'échantillon. L'utilisation de 12 cochons devrait être suffisante pour obtenir des résultats statistiquement analysables.
- Raffinement : Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post-opératoires modérées. Les animaux recevront un protocole de soins post-opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs/anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipés en cas de survenue d'une complication ont été définis.

8041 Les angiomes caverneux ou CCM sont des malformations vasculaires localisées principalement dans le cerveau des patients mais aussi dans la rétine. Cette pathologie touche de 0.1 à 0.5% de la population. Dans 20% des cas, la maladie est héréditaire, causée par la mutation d'un des 3 gènes identifiés, « CCM1/2/3 ». Les lésions CCM sont assez semblables, quel que soit le gène CCM affecté mais une plus forte sévérité a été observée chez les patients CCM3 avec un nombre plus important d'enfants atteints. La maladie est très évolutive, puisque le nombre et la taille des lésions augmentent au cours de la vie. Les angiomes caverneux peuvent entraîner des crises d'épilepsie et/ou des déficits neurologiques dus à des hémorragies cérébrales répétées. L'unique traitement possible est l'ablation de l'angiome (neurochirurgie), qui se révèle impossible si la malformation est trop profonde en raison du risque vital. L'absence de traitement est donc un problème majeur notamment pour les enfants porteurs d'une mutation CCM3 et les patients non opérables. Il est urgent de réussir à définir des approches thérapeutiques préventives visant à la fois à éviter le développement de nouvelles lésions mais aussi à empêcher le grossissement des lésions existantes.

La souris est un modèle animal qui possède toute la complexité du réseau vasculaire cérébral trouvé chez l'homme. Les outils nécessaires pour induire une mutation dans l'un des gènes CCM chez la souris sont disponibles. Nous avons développé plusieurs modèles CCM chez la souris, qui

reproduisent fidèlement les malformations CCM du cerveau et de la rétine des patients. Il n'existe pas d'équivalent aujourd'hui en dehors de ces modèles CCM chez la souris pour pouvoir réaliser des tests précliniques. Nous avons caractérisé de façon précise des modèles murins obtenus après invalidation d'un des gènes CCM1/2/3 au premier jour de vie chez le souriceau. Dans ces modèles, dit « sévères », la maladie se développe très rapidement puisqu'une semaine après l'invalidation du gène la totalité des animaux montrent des lésions dans le cerveau et la rétine. Des essais thérapeutiques préventifs seront effectués dans ce modèle dans le but de définir des approches pharmacologiques pour les patients.

L'objectif de notre projet est d'évaluer l'effet potentiel d'agents pharmacologiques candidats (4 maximum) au cours d'essais thérapeutiques précliniques préventifs dans les modèles sévères de la maladie CCM chez la souris.

Toutes les procédures expérimentales sont mises en œuvres par des personnes expérimentées et sont utilisées depuis plusieurs années dans notre laboratoire (procédures autorisées précédemment). La procédure n°1 consiste en une unique injection intra-gastrique, au 1^e jour de vie, d'une molécule permettant de déléter l'un des gènes CCM et de déclencher le développement de la maladie chez la souris. Cette procédure concernera la totalité des animaux inclus dans ce projet (78-96 souris par composé, soit 312-384 souris total pour les 4 composés). Les procédures n°2 ou 3 consistent en l'administration d'un des composés thérapeutiques candidats sur 6 jours consécutifs par injection intra-péritonéale ou voie orale. Ces procédures ont pour but d'évaluer l'efficacité potentielle préventive de chacun des agents thérapeutiques candidats sur le développement des lésions. Tous les animaux concernés par l'essai thérapeutique sont analysés à un stade où nous n'avons décelé aucun signe de souffrance lors de nos précédentes études (1 semaine après la délétion du gène). Ce stade est parfaitement caractérisé, ce qui nous permet de définir au plus juste le nombre d'animaux nécessaire à nos analyses, grâce à des calculs de puissance statistique (logiciel GPower3.1).

Les animaux sont maintenus dans les conditions standards d'hébergement, des mouchoirs en papier sont déposés dans leurs cages pour permettre la confection du nid. Tous les animaux concernés par les procédures décrites seront surveillés quotidiennement par une personne responsable du bien-être du projet.

8042 La dépression est l'un des troubles psychiatriques les plus répandus. La première classe d'antidépresseurs utilisés sont les inhibiteurs sélectifs de la recapture de la sérotonine (ISRS). Cependant, certaines études suggèrent que, chez les enfants et les adolescents, l'administration d'ISRS provoquerait une augmentation des comportements agressifs et suicidaires. Nous avons montré qu'un traitement par un ISRS entre le 8^{ème} et le 21^{ème} jour post-natal chez le raton entraînait un état anxio-dépressif à l'âge adulte. Une diminution de l'activité électrique des neurones sérotoninergiques du raphé est observée chez le rat adulte ayant reçu un traitement post-natal d'antidépresseur, mais les mécanismes qui sous-tendent ces effets délétères restent encore mal connus. Le transporteur membranaire de la sérotonine (SERT pour serotonin transporter) joue un rôle clef dans la modulation de la neurotransmission assurée par cette monoamine. Les ISRS augmentent la transmission sérotoninergique en se fixant avec une haute affinité sur le site primaire du SERT, inhibant ainsi la recapture de la sérotonine. Outre ce site à haute affinité, le SERT est porteur d'un deuxième site de liaison à basse affinité qui aurait pour fonction la modulation de la liaison de la sérotonine au site primaire. Nous avons montré précédemment que des souris transgéniques porteuses d'un transporteur humain avec une mutation ponctuelle sur le site à basse affinité du SERT bloquant sa fonction présentaient un état moins dépressif que les souris normales et une plus faible sensibilisation à la cocaïne. Par ailleurs, un antidépresseur, le Citalopram, est composé de deux formes, le S-citalopram se fixant sur le site primaire en inhibant la recapture de la sérotonine et donc responsable de l'effet antidépresseur et le R-citalopram, inhibiteur du site à basse affinité du SERT et diminuant l'effet du S-citalopram. Or nous avons trouvé qu'un traitement post-natal avec du R-citalopram n'avait aucun effet sur le comportement à l'âge adulte. Pour mieux comprendre le rôle du site à basse affinité dans l'effet délétère des ISRS nous nous proposons de traiter des rats entre le 8^{ème} jour et le 21^{ème} jour post-natal avec du R-citalopram et de vérifier son effet sur l'humeur et sur la réponse à la cocaïne des sujets.

De plus, dans un modèle de dépression bipolaire induit par une activation immunitaire maternelle prénatale, grâce à l'injection d'un agent inflammatoire chez la femelle gestante, nous tenterons de contrer ses effets pathologiques par des traitements chroniques de R-citalopram et de S-citalopram à l'âge adulte.

Il s'agit d'un projet de recherche translationnelle qui a pour finalité de mettre au point de nouveaux antidépresseurs ayant une meilleure efficacité et moins d'effets secondaires. Cette étude préclinique doit être effectuée chez l'animal pour que les effets comportementaux de l'administration d'antidépresseur puissent être observés, ainsi que l'enregistrement de l'activité électrique qui résulte de l'intégration de nombreux signaux émis par une variété de régions cérébrales différentes. Nous procéderons sur le rat et non pas sur la souris car compte tenu de la petitesse du cerveau de cette espèce, le nombre de cellules enregistrables est moindre et nécessiterait un plus grand nombre d'animaux.

Un nombre total de 165 rats sera utilisé : 75 seront traités par du R-citalopram, 15 par du S-citalopram et 75 par du sérum physiologique. Les traitements chroniques seront effectués par l'intermédiaire d'une pompe Alzet, ce qui évitera une piqure quotidienne. La variabilité interindividuelle classique du vivant nécessite d'utiliser plusieurs animaux pour obtenir des résultats comportementaux fiables. Les plans expérimentaux tenant compte de la variabilité interindividuelle prévoient l'utilisation minimum de 15 rats par groupes selon le test statistique PS de Dupont et Plummer. Par contre, les expériences électrophysiologiques pourront être réalisées sur les rats ayant préalablement effectués les tests comportementaux. Ceci limite au final le nombre nécessaire d'animaux. Les injections intrapéritonéales de R-citalopram présentent une sévérité de classe modérée. L'évaluation des comportements anxio-dépressifs, de la mémoire, de l'activité électrique du raphé et de l'hippocampe et de la neurogenèse est classée "sans réveil", par contre l'activation immunitaire maternelle prénatale suivie d'un traitement chronique par un antidépresseur présente une sévérité modérée. Cependant, le geste chirurgical sera précédé d'une anesthésie générale et de l'application locale d'un analgésique. Tous les animaux seront mis à mort après l'expérience d'électrophysiologie pour des études histologiques. Cette recherche durera 5 ans. Mots clefs : Dépression, antidépresseurs, effets secondaires

8043 La thrombose veineuse profonde (TVP) est une maladie fréquente et grave, associée à un risque précoce d'embolie pulmonaire et, à terme, d'insuffisance veineuse sévère, dénommée syndrome post-thrombotique (SPT). Le SPT est dû principalement à la persistance de l'occlusion de la veine non recanalisée. La compression veineuse reste le seul traitement validé afin de diminuer l'intensité des symptômes du SPT.

Ces dernières années ont vu émerger des techniques de recanalisation de la veine ayant pour but de prévenir le SPT. La thrombolyse pharmacologique ne s'est pas généralisée du fait des complications hémorragiques. L'objectif des thérapeutiques en développement est donc de permettre une recanalisation efficace de la veine thrombosée, sans traitement systémique afin d'éviter tout risque d'hémorragies majeures.

L'histrotripsie est une technique ultrasonore récente, permettant de fragmenter des tissus biologiques à distance, grâce au positionnement d'un transducteur externe. Appliquée à la veine thrombosée, cette technique peut permettre la destruction du thrombus (ou thrombotripsie) en de petits fragments, sans altération des tissus. Ceci autorise une procédure non invasive, locale, rapide, sans traitement pharmacologique associé et immédiatement contrôlée par l'imagerie échographique couplée.

Afin de permettre le développement d'un nouveau dispositif externe de recanalisation veineuse, il convient de s'assurer de la sécurité du dispositif. Les principaux risques identifiés sont l'effraction de la paroi veineuse et le risque d'une embolie pulmonaire par migration d'un volumineux fragment.

L'étude de la destruction d'un thrombus par cavitation s'est surtout développée in vitro. L'évaluation in vivo nécessite un modèle animal avec une anatomie vasculaire et des diamètres veineux comparables à ceux observés chez l'homme.

L'objectif principal est la validation du dispositif de thrombotripsie en termes d'efficacité de recanalisation veineuse et de sécurité sur les risques d'altération veineuse et d'embolie pulmonaire dans un modèle porcin.

Méthodes

Dans l'objectif de suivre la règle des 3R, et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins scientifiques, nous avons évalué à 28 le nombre minimum de porcs nécessaires. Sous anesthésie générale profonde, une thrombose de la veine fémorale commune sera réalisée par obstruction veineuse par voie endovasculaire. L'occlusion sera maintenue 2h avec anticoagulation systémique intraveineuse.

Après confirmation d'un thrombus occlusif, la recanalisation sera effectuée chez une partie des porcs à l'aide du transducteur placé au contact de la cuisse. Une évaluation immédiate de la perméabilité de la veine sera réalisée par échographie-Doppler et phlébographie. Le réveil sera appliqué à une partie des porcs pour évaluation du suivi pendant deux semaines. Durant cette période, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire avec surveillance des points limites.

Au terme du suivi, différentes imageries seront réalisées sous anesthésie générale profonde : une phlébographie, une artériographie pulmonaire et une échographie-doppler, afin d'évaluer la perméabilité de la veine fémorale et les conséquences de la recanalisation veineuse à distance.

Le critère principal d'efficacité est le taux de perméabilité de la veine fémorale chez les porcs recanalisés par rapport aux contrôles après 14 jours de suivi.

Afin de limiter le plus possible la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux, les procédures se dérouleront sous anesthésie générale profonde avec une analgésie préopératoire. Au cours du suivi, l'analgésie sera adaptée quotidiennement par le vétérinaire en charge du projet.

Ce travail permettra de valider l'efficacité et l'innocuité du dispositif ultrasonore non invasif de recanalisation veineuse, dans la perspective d'un développement clinique novateur de la prise en charge de la TVP chez l'homme.

8044 Le cancer est un terme général désignant toute maladie pour lesquelles certaines cellules du corps humain se divisent d'une manière incontrôlée. Le nombre de nouveaux cas de cancer estimés en 2015 est de 385 000 en France métropolitaine, tandis que sa mortalité est estimée à 149 500 décès. Dans ce contexte, il existe différents types de traitements qui peuvent être utilisés. La chimiothérapie est un traitement médicamenteux qui agit par voie générale, c'est-à-dire qu'elle agit sur les cellules cancéreuses dans l'ensemble du corps. Ce mode d'administration présente deux inconvénients :

- toxicité associée
- élimination rapide des molécules

Pour pallier ces 2 effets délétères une formulation galénique de type nanoparticulaire peut être utilisée. En effet, l'utilisation de celle-ci permettrait d'augmenter la durée d'action des chimiothérapies et de réduire les effets secondaires associés.

Des formulations de principe actif (PA) ont été développées depuis plusieurs années. Afin de déterminer leur intérêt, ce projet propose de comparer la distribution in vivo (pharmacocinétique) des chimiothérapies seules à celle des mêmes médicaments encapsulés. Pour cela seul un système complexe tel l'animal peut permettre de répondre à cette question. Dans cette étude la souris saine est le modèle animal le plus adapté pour atteindre nos objectifs. Les souris recevront une administration unique de médicament formulé ou non par voie intraveineuse, puis à différents temps des prélèvements de sang seront effectués. Vingt-quatre heures après l'administration, les souris seront mises à mort, les organes seront prélevés pour effectuer une analyse histologique. Cette étude, prévue sur 5 ans, nécessitera 432 souris, nombre justifié par l'étude réalisée et par le nombre de formulations (18 au total).

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement pensées et élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir des résultats statistiquement satisfaisants. Nous avons en effet préalablement évalué par des études in vitro plusieurs formulations pour ne tester chez l'animal que les formulations finales, ce qui nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur adaptée à ce projet a été élaborée pour surveiller l'état général de l'animal, l'apparence et le

comportement de l'animal, révélateurs du niveau de douleur. Des antalgiques sont prévus en cas de nécessité et un niveau de douleur trop élevé entraînera l'euthanasie anticipée de l'animal.

Ainsi, grâce à ces études pharmacocinétique nous pourrions identifier des formulations de composés à visée anti-tumorale ou anti-vasculaire plus efficace et moins toxique que les principes actifs non formulé ce qui pourrait permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant le cancer.

8045 Le diabète et l'obésité sont des maladies souvent induites par un déséquilibre alimentaire tel que l'augmentation de la proportion de graisse. Des travaux récents de la littérature montrent que le régime riche en gras modifie le microbiote intestinal. Celui-ci est composé d'un très grand nombre de bactéries que l'on peut identifier en séquençant leur ADN. L'écologie microbienne varie en fonction de sa distribution tout au long du tractus digestif. Des molécules produites par les bactéries interagissent avec le système immunitaire de l'hôte pour en contrôler le métabolisme énergétique et ainsi la glycémie. La diversité du microbiote est supérieure à 500 000 gènes et la variabilité du système immunitaire s'y adapte. Le projet consiste en l'étude des relations moléculaires entre le microbiote intestinal et le système immunitaire en réponse à des régimes riches en graisses pour le contrôle du poids et de la glycémie, pour identifier des approches probiotiques et de vaccination.

Compte tenu de la diversité génétique et immunitaire nous réaliserons des groupes expérimentaux de 50 souris. 20 régimes différents seront évalués sur 5 années. Le nombre total de souris évalué pour ce projet est donc de 1000.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

Remplacement : Pour ce projet, le recours à l'expérimentation sur des animaux est indispensable. En effet, aucune étude in vitro ne peut rendre compte des variations de glycémie dans l'organisme.

Réduction : Les effectifs des cohortes sont limités par l'outil statistique. Les études antérieures effectuées nous ont permis de d'optimiser l'utilisation de ces modèles murins, permettant de ce fait d'en réduire le nombre. Pour chaque expérience, le maximum d'échantillons sont extraits de l'animal afin d'éviter d'avoir à reproduire l'expérience par manque de matériel biologique.

Raffinement : L'expérimentation fait l'objet d'une procédure de suivi du bien-être des animaux adaptée à l'expérience et aux potentiels effets indésirables des procédures, sur l'état de santé global des animaux. De plus ce protocole n'induit aucune douleur chez l'animal et les études antérieures nous ont permis de mieux appréhender les points limites pour le bien-être des animaux.

8046 Contexte scientifique :

La mort subite cardiaque n'est pas seulement une tragédie pour le patient et sa famille mais est également un problème de santé publique de par son incidence et son coût élevé pour la société.

En Europe, l'incidence avoisine un pour mille habitants chaque année soit environ 700 000 personnes. La soudaineté de ces décès résulte dans la faible capacité à prévoir, à diagnostiquer mais également à traiter efficacement et préventivement les patients à haut risque. Dans la majorité des cas, les patients sont soumis à un traitement par bêtabloquant mais ce dernier est insuffisamment efficace. En effet, la majorité des décès soudains ont lieu alors que les patients sont sous cette thérapie. Ceci témoigne que d'autres types de récepteurs adrénérgiques peuvent être impliqués.

Comprendre l'étiologie de la mort subite est donc indispensable et justifie la recherche fondamentale de nouvelles voies de signalisation impliquées dans la mort subite cardiaque, notamment la voie impliquant les récepteurs adrénérgiques cardiaques. Ces récepteurs permettent l'action du système nerveux sur le cœur comme lors d'un effort. Nous avons déjà montré chez le singe et le chien qu'un type d'arythmies souvent fatales nommées "torsades de pointes" nécessite l'activation du système sympathique, mais sans avoir déterminé le type de récepteurs impliqué. La particularité de ces arythmies est qu'elles sont souvent déclenchées par la prise de molécules, y compris des médicaments. La détermination du type de récepteurs impliqués aux niveaux nerveux et cardiaques serait une avancée scientifique primordiale pour faire évoluer les stratégies anti-arythmiques.

Hypothèse :

L'activation des récepteurs beta-1 adrénrgiques couplée à l'activation des récepteurs alpha1 adrénrgiques est indispensable à la genèse de torsades de pointes.

Objectif et résultats attendus :

Nous souhaitons déterminer l'implication des récepteurs alpha1-adrenergiques et béta 1 adrénrgiques dans la genèse des troubles du rythme. Pour cela, nous allons utiliser une molécule connue pour initier des torsades de pointes (ATXII, bloqueur de l'inactivation des canaux sodiques). Par une approche pharmacologique, nous allons ainsi déterminer l'implication des voies adrénrgiques (et cholinergiques) nerveuses et cardiaques. L'objectif final est d'identifier les acteurs du déclenchement sur un modèle murin sain (228 animaux au maximum sur 5 ans) et tenter de déterminer une stratégie anti arythmique (préventive) des torsades de pointes. Cette étude sera réalisée en accord avec le principe des 3R avec notamment le but de réduire le nombre d'animaux en utilisant le système de télémétrie. Il n'existe pas de méthode alternative in vitro ou in silico permettant de répondre à nos questions scientifiques. Les procédures sous cutanée de ce protocole sont classifiées de palier 1 selon les normes FELASA. Des soins per- et postopératoires appropriés seront réalisés dont une analgésie (buprénorphine) pour réduire la douleur des animaux, au cas par cas.

8047 De nombreuses personnes sont allergiques au lait et ont des réactions quand ils consomment du lait sous toutes ses formes. Par conséquent, ils ne doivent pas consommer de produits laitiers. Afin de répondre aux besoins nutritionnels de ces personnes et d'avoir une alternative au lait, un industriel souhaite développer une boisson composée d'un ingrédient alimentaire et dont la composition nutritionnelle serait similaire au lait.

L'objectif de ce projet est donc de déterminer si l'ingrédient alimentaire qui sera utilisé dans la boisson développée ne provoque pas de réactions chez des sujets allergiques au lait. Comme l'allergie est une maladie complexe faisant intervenir plusieurs systèmes physiologiques (notamment le système immunitaire et le système digestif), il n'est pas possible de mener cette étude sur des cultures cellulaires et par conséquent il est nécessaire d'étudier cela chez l'animal avant de faire des études chez l'Homme.

Le modèle animal choisi sera la souris car c'est un modèle reconnu pour étudier les allergies et pour lequel il y a le plus de données dans la littérature. Des souris mâles âgées de 6 semaines seront réparties en trois groupes : un groupe de souris allergiques au lait qui ingèreront du lait, un groupe de souris allergiques au lait qui ingèreront l'ingrédient alimentaire à tester et un groupe contrôle où les souris ne seront pas allergiques au lait. Les réactions allergiques seront évaluées par deux expérimentateurs à l'aide d'une grille de scores déjà définie. Vingt-quatre heures après cette ingestion, les souris seront mises à mort afin de prélever les fluides biologiques et organes qui seront analysés.

L'étude expérimentale est une étude originale, réalisée pour la première fois. Cette étude n'est donc pas la répétition d'études identiques antérieures. Le nombre d'animaux choisis correspond au nombre minimum d'animaux par groupe (10 souris par groupe, soit un nombre total d'animaux égal à 30) permettant de comparer les groupes et de déterminer s'il existe une différence statistique entre eux.

Les animaux seront placés par 5 dans des cages adaptées à leur taille et au nombre. Des igloos jetables et des roues d'activités, offrant aux animaux la possibilité de se cacher ou de faire de l'exercice, seront systématiquement mis à disposition dans les cages et renouvelés régulièrement. Les animaux seront nourris avec une alimentation standard. La nourriture et l'eau seront à volonté.

Compte tenu des objectifs de l'étude et des contraintes expérimentales, nous avons pris toutes les mesures nécessaires pour respecter la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

8048 Le glaucome est une altération des fibres nerveuses de la tête du nerf optique (papille), responsable d'une détérioration irréversible du champ visuel pouvant conduire à la cécité. Son développement est favorisé par une élévation de la Pression Intra Oculaire (PIO). Les traitements actuels visent principalement à réduire la PIO en diminuant la sécrétion de l'humeur aqueuse (liquide contenu dans la chambre antérieure de l'œil entre la cornée et le cristallin) et/ou en facilitant son évacuation. Le canal de Schlemm est l'une des voies principales pour le drainage de l'humeur aqueuse. Des travaux récents ont proposé que les vaisseaux lymphatiques, présents au niveau oculaire, constituent une nouvelle voie de drainage de ce fluide.

Il a été également établi que les cellules de la paroi du canal de Schlemm présentent plusieurs caractéristiques des vaisseaux lymphatiques. Un rôle crucial de la protéine BMP9 dans le développement et la maturation des vaisseaux collecteurs lymphatiques, ayant un impact fonctionnel sur l'efficacité du drainage lymphatique, a été rapporté. Par ailleurs, il est connu qu'une autre protéine, la VE-cadhérine, présente sur les cellules endothéliales lymphatiques ainsi que sur les cellules de la paroi du canal de Schlemm, est essentielle dans la régulation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire, et donc le passage de fluides.

Cette étude vise à approfondir les rôles potentiels de BMP9 et d'une version mutée de la VE-cadhérine sur le développement du canal de Schlemm et des vaisseaux lymphatiques de l'œil. L'étude des effets fonctionnels dans le drainage de l'humeur aqueuse par les vaisseaux lymphatiques sera également poursuivie. Le programme de travail consistera à suivre la formation de ces vaisseaux à différents âges lors du développement ainsi que l'évacuation d'un traceur fluorescent injecté dans la chambre antérieure de l'œil. Les travaux nécessiteront des souris non mutées et des souris déficientes en BMP9 ou disposant d'une version mutée de la VE-cadhérine.

Aucune méthode cellulaire ou informatique ne peut fournir ces informations importantes pour établir si ces protéines peuvent constituer de nouvelles cibles d'intérêt pour les approches pharmacologiques visant à réguler le drainage de l'humeur aqueuse et par conséquent la pression intraoculaire. Le recours à des investigations in vivo s'avère nécessaire.

Les animaux sont nés et élevés dans un établissement agréé. Le nombre de 436 animaux utilisés a été déterminé sur la base des données des travaux scientifiques publiés et pour répondre à l'exigence des tests statistiques. Les expériences seront par ailleurs effectuées sur un mode longitudinal afin de n'utiliser que le minimum nécessaire d'animaux, ceci en utilisant les mêmes animaux pour les analyses histologiques et les tests fonctionnels lorsque réalisés. L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de douleur, de souffrance ou d'angoisse. Les protocoles d'anesthésie et d'analgésie, réalisés au moment des procédures expérimentales, ont été définis et validés par une équipe vétérinaire. L'application de critères d'arrêts et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe garantissent le respect du bien-être des animaux. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance. Les animaux sont hébergés en groupe dans un milieu enrichi.

8049 Nos modes de vie (diagnostics médicaux) et la survenue d'évènements exceptionnels, tels que des accidents nucléaires ou des attaques terroristes radiologiques, représentent un risque pour les populations exposées aux rayonnements ionisants (RI) qu'il est important d'évaluer. Il existe encore peu d'études sur les effets de ce type d'exposition, à faibles doses, sur les fonctions cérébrales chez l'homme. Certaines d'entre elles suggèrent malgré tout qu'une exposition externe aux RI, au cours du développement du système nerveux central, pendant l'enfance, pourrait entraîner l'apparition de troubles cognitifs persistants à long terme chez l'Homme. Ce domaine de recherche a fait l'objet de peu d'étude par la communauté scientifique. Le but de nos études expérimentales est d'améliorer nos connaissances scientifiques sur les troubles cognitifs susceptibles de survenir suite à une exposition externe du cerveau à des doses de RI comprises entre 0,25 et 2 Gy.

Dans cette étude, les conséquences de l'exposition du cerveau de jeunes souris à ces RI sur la mémoire spatiale, à l'âge adulte, seront étudiées. Le test de mémoire qui sera mis en place permettra d'évaluer l'intégrité du fonctionnement d'une structure cérébrale : l'hippocampe ; et, plus précisément, d'un phénomène biologique se déroulant en son sein : la neurogenèse adulte, après exposition aux RI. Par la comparaison des résultats obtenus avec nos deux modèles d'exposition aux RI : un modèle d'irradiation du cerveau entier vs un modèle d'irradiation localisé du gyrus denté de l'hippocampe dorsal, le rôle spécifique de cette sous structure cérébrale (où se déroule la neurogenèse) dans l'apparition de troubles de la mémoire spatiale, après irradiation, pourra être évalué. Puis, toujours en utilisant en parallèle ces deux modèles d'irradiation, les effets directs et indirects des RI sur le gyrus denté pourront être décryptés, au niveau moléculaire cellulaire. Les doses d'exposition faibles et modérées utilisées dans cette étude expérimentale ne doivent pas engendrer de souffrance chez les animaux. Ils seront malgré tout observés quotidiennement afin de vérifier leur bien-être.

Pour la réalisation de cette étude 324 souris mâles âgées de 10 jours seront utilisées sur une période de 3 ans. L'utilisation d'animaux est indispensable à la mise en place de tests comportementaux permettant d'étudier les fonctions cognitives. L'approche expérimentale que nous souhaitons mettre en place nécessitera pour chaque dose d'irradiation l'utilisation de deux groupes d'animaux (champ large du cerveau vs irradiation stéréotaxique). Cette approche innovante permettra de prendre en considération le fonctionnement intégré du cerveau dans l'apparition de ces troubles. De nouvelles réponses scientifiques quant aux mécanismes biologiques sous-tendant ses troubles ainsi que la manière dont les RI impactent le cerveau ou une sous structure cérébrale seront alors apportés. Afin de répondre au type de questions scientifiques soulevées dans ce projet, il n'existe pas de test in vitro substitutif. Dans l'objectif de répondre à l'exigence des 3R nous choisirons pour chaque expérimentation un nombre d'animaux permettant d'avoir une bonne puissance statistique pour obtenir des résultats scientifiques robustes sans avoir à effectuer de nouvelles expérimentations.

8050 La rhabdomyolyse se définit par une rupture de l'intégrité des cellules musculaires striées squelettiques, responsable de la fuite du contenu intracellulaire dans la circulation générale. L'insuffisance rénale aiguë est une complication sévère et fréquente de la rhabdomyolyse. Parmi l'ensemble des mécanismes impliqués, la vasoconstriction rénale est un élément important, responsable d'une hypoperfusion rénale. La survenue d'une insuffisance rénale aiguë au cours d'une hospitalisation est un facteur de risque indépendant de mortalité hospitalière et expose au risque d'insuffisance rénale chronique.

Dans notre pratique clinique en traumatologie sévère, la rhabdomyolyse est fréquemment associée à une hémorragie. Au cours d'une hémorragie, l'hypovolémie (diminution de la masse sanguine) est à l'origine également d'une hypoperfusion tissulaire et participe donc à l'aggravation des conséquences de la rhabdomyolyse, à savoir l'insuffisance rénale aiguë.

Le suivi de la perfusion rénale (apport de nutriments et d'oxygène au rein via le sang) est rendu possible par l'utilisation de l'échographie rénale de contraste. Cette technique, encore très peu utilisée sur le petit animal, permet de visualiser la vascularisation du rein et de quantifier sa perfusion microcirculatoire.

L'objectif de ce projet est de caractériser les lésions rénales provoquées par un double traumatisme associant choc hémorragique et rhabdomyolyse (induite par injection intramusculaire de glycérol), chez le rat réanimé. Ce modèle, une fois validé, aura pour but, de tester l'efficacité de différentes stratégies réanimatrices lors de ces agressions sur la fonction rénale. Nous évaluerons donc la fonction et la perfusion rénale en deux temps :

1. En aiguë, c'est-à-dire immédiatement après la survenue d'une rhabdomyolyse ainsi que pendant les phases d'hémorragie aiguë et de réanimation de cette hémorragie : nous suivrons l'évolution de la perfusion rénale, des marqueurs biologiques de la fonction rénale et des constantes hémodynamiques.

2. A distance du double traumatisme, soit 24h après l'induction de la rhabdomyolyse associée ou non à un choc hémorragique contrôlé, nous ferons une mesure de la perfusion rénale, des marqueurs biologiques de la fonction rénale et des constantes hémodynamiques.

Au maximum, 96 rats, répartis en deux séries (la première série dans la phase aiguë et la seconde série à distance du traumatisme) de quatre groupes de 12 animaux (contrôle, rhabdomyolyse seule, choc hémorragique seul, rhabdomyolyse et choc hémorragique), seront nécessaires pour réaliser ce projet. Actuellement, il n'existe aucune méthode in vitro permettant de répondre à notre objectif. Cependant, d'après la littérature, 8 animaux par groupe sont suffisants pour valider une différence de l'atteinte rénale entre un groupe sain et un groupe ayant subi une rhabdomyolyse, c'est pourquoi dans un souci de réduction du nombre d'animaux, nous arrêterons l'expérimentation dès l'inclusion de 8 rats par groupe. Cette mesure pourrait épargner l'utilisation de 32 rats. En ce qui concerne le raffinement, le confort et le respect du bien-être des animaux, un soin constant sera porté pour assurer l'antalgie par injections de buprénorphine et l'anesthésie par inhalation d'un gaz anesthésiant. Si l'animal présente des signes de souffrance (prostration, fréquence respiratoire anormalement rapide ou lente, poil hirsute), il sera mis à mort par surdose d'anesthésie gazeuse. Les animaux seront placés dans les conditions standards d'animalerie, soit par 4 dans une cage avant procédure, soit dans une

cage individuelle selon la procédure réalisée : eau et nourriture ad libitum, température entre 20 et 22°C, cycle jour/nuit de 12h/12h.

8051 L'infection à *M. ulcerans* est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Chez l'homme, lorsque les lésions ne sont pas traitées, elles peuvent évoluer vers un processus spontané de cicatrisation. Il y a deux ans, nous avons rapporté que des souris FVB/N, inoculées par *M. ulcerans* présentent des lésions identiques à celles observées dans les souches C57Bl/6 et Balb/c, mais évoluent vers une cicatrisation. Cette étude met en exergue l'existence de facteurs génétiques de susceptibilité à l'infection par *M. ulcerans*. Nous avons donc initié une étude de génomique comparative entre les souches C57Bl/6 Balb/c et FVB/N. Brièvement, il est apparu que les souris FVB/N contrairement aux autres souches murines, étaient déficientes pour un récepteur couplé aux protéines G nommé GPR84. À ce stade de nos travaux et au vu de l'importance de nos résultats obtenus in vitro, il est essentiel de déterminer si GPR84 est un acteur principal de l'initiation de la cicatrisation spontanée ou si GPR84 joue un rôle dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans*. Seule l'utilisation de modèles animaux développés spécifiquement pour notre étude pourra répondre à cette question. Dans ce but, nous avons obtenu des animaux transgéniques (souris C57Bl/6 déficientes pour GPR84). L'utilisation de ces souris nous permettra de démontrer formellement le rôle de GPR84 dans la physiopathologie de l'infection à *M. ulcerans* et d'identifier les acteurs cellulaires et moléculaires sous-jacents.

Un nombre total de 100 souris sera nécessaire à ce projet. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, réduction, Raffinement) qui consiste à n'utiliser que le nombre nécessaire d'animaux pour mener à bien cette étude tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités Le bien-être animal a été une des priorité dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Un suivi journalier sera effectué sur l'ensemble des animaux.

8052 La formation des chirurgiens nécessite des apprentissages pratiques aussi bien que théoriques. Après de nombreuses séances d'observation vidéo et des simulations de chirurgie sur des pièces anatomiques et des substituts, il est encore nécessaire de recourir à des séances de formation avec des animaux vertébrés pour se retrouver dans la situation d'un tissu vivant, mobile et vascularisé. Les enseignements de microchirurgie peuvent être réalisés avec des rongeurs, car leurs vaisseaux et nerfs ont une taille et une structure comparables à des cibles d'intérêt médical de l'Homme. Ces séances, réalisées en nombre limité dans le cadre d'un programme de formation, ont pour objet de finaliser l'apprentissage technique de microdissection et sutures sous microscope opératoire. Chaque stagiaire a un rat à sa disposition par séance. Les étudiants sont supervisés par un chirurgien confirmé. Un maximum de 800 animaux est prévu sur 5 ans pour l'ensemble des formations initiales et continues des chirurgiens en microchirurgie vasculaire et nerveuse dans plusieurs domaines d'application médicale courante. Le bien-être des animaux est respecté par une manipulation douce et calme d'animaux habitués à l'Homme. Ils sont hébergés en groupe d'individus compatibles, de la litière foisonnante et des tubes en carton sont mis à leur disposition. Une anesthésie profonde est réalisée dans les règles de l'art durant tout le temps opératoire. Les animaux sont mis à mort sans risque de réveil dès la fin des actes chirurgicaux. Le nombre des animaux est réduit au minimum grâce à une gestion soigneuse des actes pratiques réalisés par chaque stagiaire.

8053 La Dystrophie Musculaire de Duchenne (DMD) est la maladie musculaire la plus fréquente chez l'enfant, touchant environ un garçon sur 5000 à la naissance. Elle résulte d'une mutation dans le gène *Dmd* situé sur le chromosome X, codant pour la protéine Dystrophine. L'absence d'expression de la Dystrophine génère une fragilité des fibres musculaires, ayant pour conséquence leur dégénérescence progressive. La maladie touche tous les muscles de l'organisme, y compris le muscle

cardiaque et le diaphragme. Le déficit en Dystrophine fonctionnelle de diminution significative des capacités motrices (course, saut, montée des escaliers...) dès l'âge de 5 ans. La marche est définitivement perdue avant 15 ans et le décès survient généralement vers 30/40 ans, suite à une insuffisance respiratoire et/ou cardiaque.

A ce jour, il n'existe pas de traitement curatif sur le marché, et la thérapie génique est une des approches envisageables pour le traitement de cette pathologie. L'évaluation d'un traitement de thérapie génique chez l'Homme nécessite au préalable une évaluation préclinique faisant preuve de son efficacité in vivo. Pour qu'une évaluation préclinique soit pertinente, il est nécessaire d'utiliser un modèle animal qui mime au plus proche le phénotype du patient DMD. Deux modèles animaux de la DMD, portant une mutation dans leur gène *Dmd*, ont été historiquement utilisés : la souris *mdx* (X chromosome-linked muscular dystrophy) et le chien GRMD (Golden Retriever Muscular Dystrophy). La souris *mdx* est loin d'être un modèle parfait puisqu'elle présente un phénotype peu sévère, avec seulement quelques aspects des lésions musculaires humaines et une fonction cardiaque peu et très tardivement atteinte. Le chien GRMD, quant à lui, se rapproche beaucoup plus de la pathologie humaine, à la fois au niveau des lésions musculaires observées qu'au niveau de son phénotype (espérance de vie très raccourcie). Il présente cependant des lésions cardiaques hétérogènes entre individus et la grande taille de ce modèle pose des problèmes d'entretien, de coût, ainsi qu'éthiques. De ce fait, seules des petites cohortes expérimentales peuvent être utilisées, rendant difficile les analyses statistiques.

En 2014, un nouveau modèle de rat DMD a été généré par transgénèse. Chez ce rat DMDmdx, les dommages musculaires sont très proches de ceux des patients DMD (nécrose, régénération, puis fibrose et adipose) et celui-ci développe une cardiomyopathie comparable à celle observée chez le patient, contrairement aux autres modèles animaux de la DMD (chien GRMD, souris *mdx*). Ce nouveau modèle animal de la DMD se révèle particulièrement intéressant, puisqu'il mime plus fidèlement la pathologie humaine que la souris *mdx*, tout en présentant moins de limitations d'utilisation que le modèle canin, permettant d'inclure un nombre plus important d'animaux dans des études.

Lors d'une précédente étude, notre équipe a pu réaliser une caractérisation exhaustive du rat DMDmdx (sur des animaux de 1,5 mois, 3 mois, 4,5 mois, 7 mois ou 12 mois), que ce soit au niveau phénotypique (fonction musculaire et cardiaque), au niveau histologique, au niveau physiologique (Homéostasie calcique) et au niveau moléculaire (marqueurs tissulaires et circulants) et ainsi confirmer la pertinence de ce nouveau modèle animal de la DMD. Cette caractérisation a également permis de cumuler des données contrôles de référence pour les futurs essais précliniques d'évaluation de traitements potentiels de la DMD qui seront réalisées dans ce modèle animal.

Plusieurs produits thérapeutiques candidats sont aujourd'hui envisagés. Le potentiel de ces stratégies a été dans un premier temps testé dans des modèles cellulaires. Cependant, les méthodes in vitro actuelles ne permettent pas l'évaluation de l'efficacité thérapeutique de ces thérapies à l'échelle de l'organisme entier, comme cela est nécessaire pour une pathologie aussi complexe que la DMD. Notre équipe souhaite donc évaluer ces traitements de thérapie génique dans le modèle de rat DMDmdx, que ce soit pour traiter l'atteinte musculaire, cardiaque ou respiratoire.

Pour établir un plan d'étude préclinique cohérent et pertinent pour l'évaluation de ces différents produits, un des enjeux est de choisir les bonnes méthodes d'évaluation du traitement, mais aussi d'inclure un nombre suffisant d'animaux pour obtenir une puissance statistique qui aboutisse à des résultats exploitables. C'est dans cet objectif que nous souhaitons réaliser différentes études "pilotes" précédant de plus larges projets précliniques, afin de collecter des données préliminaires et déterminer (i) les méthodes d'évaluation pertinentes pour chacun de ces produits et (ii) le nombre d'animaux à inclure dans les futurs projets précliniques, en fonction de la puissance de chacune de ces méthodes. Ces études précliniques pilotes permettront ainsi l'établissement d'un plan d'étude cohérent et adapté à une problématique d'une étude précise, afin donc de répondre au mieux à la règle des 3R.

Dans ce projet s'étalant sur 5 ans, nous réaliseront un maximum de 15 études pilotes comportant entre 5 et 10 rats DMDmdx par groupe expérimental. Un total maximum de 360 rats DMDmdx seront inclus dans ces études pilotes (rats DMDmdx injectés et non injectés) ainsi que 120 rats sains contrôles. Avec l'objection de réduction (règle des 3R), le nombre d'animaux par groupe est basé sur

notre expérience de protocoles de thérapie génique lors desquels nous avons pu obtenir des résultats exploitables avec ces effectifs. Le nombre précis d'animaux par groupe (entre 5 et 10), les paramètres évalués ainsi que la durée de suivi des animaux seront ajustés en fonction du produit et de l'objectif visé. Le traitement s'effectuera par voie intramusculaire ou intraveineuse. Avec l'objectif de raffinement (règle des 3R), les protocoles d'anesthésie et d'analgésie seront mis en place en fonction des procédures expérimentales. L'état général de chaque animal sera surveillé de façon quotidienne pour estimer une éventuelle gêne ou douleur liées à l'expression clinique de la maladie. Si nécessaire, l'euthanasie de l'animal sera anticipée.

8054 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. La transfusion de concentrés plaquettaires est le seul traitement actuellement disponible dans certains cas de déficiences plaquettaires aiguës ou chroniques, héréditaires ou acquises lors des chimiothérapies anticancéreuses par exemple. La production de plaquettes in vitro, en vue de pouvoir un jour suppléer au don de sang, en est encore à ces balbutiements et comprendre comment les plaquettes sont formées au sein de la moelle osseuse est clé pour pouvoir comprendre comment traiter les patients accusant une forte diminution de plaquettes (thrombopénie), et à long terme optimiser la production de plaquettes in vitro.

Dans ce projet, nous nous intéressons au rôle de certains récepteurs permettant aux mégacaryocytes de ressentir la rigidité de l'environnement. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris dépourvues d'un récepteur mécanosensible de type 1 ou de type 2, ainsi que des 2 récepteurs uniquement dans les mégacaryocytes. Le suivi de la numération sanguine est effectué par prélèvement de sang à 4-5 reprises à l'extrémité de la queue de la souris sous anesthésie générale. Ce projet fera appel à 180 souris.

Ce projet permettra de comprendre comment certains récepteurs des mégacaryocytes sont impliqués dans la formation des plaquettes in situ avec pour objectifs 1) de les cibler chez l'homme pour améliorer le rendement de formation des plaquettes chez les patients thrombopéniques héréditaires ou traités par chimiothérapie ; 2) de recréer en bioréacteur in vitro les différentes composantes présentes in vivo permettant d'avoir un rendement optimal de production de plaquettes in vitro.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : pour le projet scientifique global, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études in vitro, d'une part car ces essais doivent être menés dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes, ce qui fait l'objet de notre projet, et d'autre part car la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus de ces récepteurs. A terme, nos résultats visent à recréer in vitro un environnement semblable à celui de la moelle osseuse.

Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Les traitements n'entraînent aucun effet dommageable, hormis une légère anémie avec le traitement 5-FU (< 50%) transitoire (1-2 jours) qui n'affecte pas la vivacité de la souris, mais qui pourrait entraîner une légère hypothermie. De ce fait, on ajoute du coton cardé dans la cage des souris traitées pour favoriser le maintien de leur température, et de la nourriture dans le fond de la cage.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition est suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance statistique de type Student pour comparer les différences entre les contrôles et chaque type de souris ko. Les résultats de l'analyse obtenus par ce test statistique permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux.

Raffiner : Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Les prélèvements de sang pour suivi cinétique de la numération plaquettaire se feront sur des souris sous anesthésie (isoflurane) pour éviter la souffrance mais favoriser un réveil rapide. Dans tous les cas, les souris restent ensemble dans la même cage durant toute l'expérience. Les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et les animaux sont manipulés avec calme et par des

manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention, dans l'intérêt du bien-être animal ainsi que de l'expérimentateur et de l'expérimentation.

8055 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente chez l'Homme. Cependant, les causes sont encore mal connues. Dans les dernières années, de nombreuses études indiquent que l'accumulation de la forme toxique de la protéine alpha-synucléine serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques et des problèmes moteurs associés. De plus, des études récentes suggèrent que l'alpha-synucléine « toxique » peut être transmise de cellule à cellule via l'espace extracellulaire, d'une façon similaire à la propagation de la protéine impliquée dans la maladie de Creutzfeldt-Jakob ou des autres maladies à prions.

Le but de notre projet est d'étudier la contribution de l'espace extracellulaire, et de son échafaudage, la matrice extracellulaire, à la propagation de l'alpha-synucléine participant au développement de la maladie. Pour répondre à cette question, nous utiliserons un modèle murin de la maladie de Parkinson basé sur la propagation de l'alpha-synucléine mal conformée. Dans ce modèle, nous explorerons l'effet de différentes modifications du réseau d'acide hyaluronique, le composant principal de la matrice, qui détermine également la viscosité de l'espace extracellulaire et influence ainsi le déplacement des molécules dans l'espace extracellulaire. Ce projet nous permettra d'évaluer l'effet de l'espace extracellulaire et ses composants sur la propagation de l'alpha-synucléine, la dégénérescence dopaminergique et l'inflammation qui en découle, afin d'améliorer notre compréhension sur l'origine de cette pathologie.

Notre approche expérimentale sera donc i) confirmer l'effet sur la densité de la matrice extracellulaire d'une molécule qui fluidifie la matrice administrée par voie orale, et une qui l'épaissit cette matrice administrée par injection cérébrale par stéréotaxie ii) L'effet à court terme de ces deux molécules sur la propagation de l'alpha-synucléine injectée par stéréotaxie avec le prélèvement du cerveau 48h après iii) L'effet à long terme de ces deux molécules sur la propagation de l'alpha-synucléine injectée par stéréotaxie avec le prélèvement du cerveau quatre mois après. Nous utiliserons pour cela 116 souris C57BL6/J.

Pour tester l'implication de la viscosité de la matrice extracellulaire dans la propagation de l'alpha-synucléine, nous avons besoin d'avoir des cerveaux entiers de souris, nous ne pouvons utiliser des modèles in vitro, nous ne pouvons pour l'heure nous passer d'utiliser des animaux vivants.

Dans le respect du R de réduire, nous avons dessiné la stratégie expérimentale de manière séquentielle afin de valider la capacité des molécules utilisées à modifier cette viscosité en vérifiant nos hypothèses à chaque étape. Le nombre de 8 animaux par groupes expérimentaux et leur contrôle a été défini pour obtenir des statistiques fiables avec le plus petit nombre d'animaux possibles. Dans le respect du R de raffiner, les expérimentateurs formés porteront une attention particulière au raffinement des procédures afin de limiter la douleur, la soulager si elle ne peut être évitée par l'utilisation d'analgiques les plus adaptés à chaque procédure, optimiser les procédures soulager le stress des animaux et leur fournir les meilleures conditions de vie tout au long du projet. Pour leur bien-être, les animaux vivent en groupes sociaux et ont à leur disposition des éléments d'enrichissement de leur milieu. L'ensemble des animaux est surveillé quotidiennement avec une surveillance renforcée après chirurgie, accrue dès qu'un signe d'appel est constaté. Pour cela, les chirurgies stéréotaxiques se feront sous anesthésie générale avec une couverture antalgique qui agira dès leur réveil et qui sera maintenue tant que l'animal montre des signes de souffrance. Des points limites suffisamment précoces seront définis pour éviter des souffrances aux animaux avec la mise en place de mesures pour les soulager comme une réhydratation, le réchauffement, une nourriture adaptée, des traitements vétérinaires si nécessaire.

8056 Les personnes souhaitant pratiquer des actes techniques ou de chirurgie sur les animaux de laboratoire doivent suivre une formation réglementaire selon l'arrêté du 1^{er} février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs d'animaux à des fins scientifiques. Cette formation comprend différents modules imposés par la réglementation.

Le nombre d'heures de pratique dans les formations réglementaires est insuffisant pour la bonne maîtrise de ces gestes.

La mise en place des formations continues et de travaux pratiques (TP) in vivo pour les expérimentateurs a pour but de bien les former afin qu'ils maîtrisent les actes qu'ils vont appliquer dans leurs projets et de répondre aux exigences de la législation française qui impose de : Tenir à jour un tableau de suivi permettant de s'assurer que le personnel dispose d'un niveau d'études, de compétences et d'une formation continue adéquats et vérifier que l'adéquation entre les compétences et les missions est effective lors de la prise de poste afin de définir, le cas échéant, un programme de formation adaptée à la personne et à la fonction exercée. La personne nominativement désignée pour cette tâche par le responsable de l'établissement tient à la disposition des agents de contrôle habilités tous les éléments permettant de vérifier que les compétences des personnels correspondent à la fonction exercée.

Notre projet est donc éducatif. Il s'agit d'accompagner et de suivre les expérimentateurs pour des actes techniques et chirurgicaux :

- préhension, contention, et manipulation adaptées aux différentes procédures de routine ;
- marquage individuel ;
- administration et prélèvements de routine ;
- anesthésie fixe et gazeuse ;
- asepsie ;
- mise à mort ;
- actes chirurgicaux : sutures, vagotomie, prélèvement d'organes (thyroïdectomie, splénectomie...), ischémie rénale, cathétérisation... sur des animaux sans réveil.

Les travaux pratiques seront précédés par des présentations théoriques où des démonstrations sous forme de vidéos seront présentées et commentées, et les avantages et inconvénients de chaque méthode seront discutés.

En matière de 3R, le bon apprentissage de ces techniques permettra de réduire les échecs des futurs expérimentateurs dans leurs projets et par conséquent le nombre d'animaux utilisés.

Par ailleurs, ce projet utilisera des animaux surnuméraires d'une activité d'élevage. Enfin, plusieurs techniques chirurgicales seront enseignées sur chaque animal pour réduire le nombre d'animaux utilisés. Au total, 1030 souris et 50 rats seront utilisés sur 5 ans, dans une procédure sans réveil et une procédure légère.

Les animaux utilisés seront mis à mort à la fin de la formation par surdosage d'anesthésique ou par dislocation cervicale.

De façon à garantir la qualité de la formation, les formateurs seront des personnels choisis pour leur compétence dans la réalisation technique de chacune des procédures et leurs aptitudes pédagogiques. Un formateur encadrera au maximum 4 personnes.

Les actes techniques appliqués sur les animaux n'ont pas d'impact sur le bien-être des animaux. Néanmoins, nous nous engageons bien entendu à mettre à mort immédiatement tout animal qui montrerait pendant la session tout signe de détresse aigüe (e.g. comportemental, respiratoire)

Tous les gestes chirurgicaux sont réalisés sur des animaux profondément anesthésiés et seront euthanasiés avant le réveil. Pour garantir une meilleure gestion de la douleur au cours de la chirurgie, un antalgique est utilisé au moins 30 min avant l'intervention.

Le Monitoring de la profondeur de l'anesthésie est assuré par la vérification très fréquente de la fréquence respiratoire et de la réponse au pincement de la patte.

8057 Nos projets de recherche impliquent des stratégies de régénération tissulaire associant biomatériaux et cellules. La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales de moins en moins invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Cette recherche d'une chirurgie mini-invasive a motivé le développement de

matériaux injectables pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Ces matrices injectables doivent pouvoir durcir une fois implantées et présenter des propriétés mécaniques comparables à celle du cartilage. Des polymères ayant un fort pouvoir épaississant dans l'eau peuvent servir à réaliser des hydrogels. Notre domaine actuel de recherche est la régénération des tissus squelettiques tels que le cartilage. Ce tissu, dépourvu de capacités de réparation intrinsèques, nécessite le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques. Notre objectif est de développer des hydrogels supports pour l'ingénierie tissulaire du cartilage. Afin d'améliorer les propriétés mécaniques de ces constructions, des renforts participent à l'élaboration, "à façon" des hydrogels. Ces constructions permettront de comprendre le rôle de différents paramètres des biomatériaux sur le comportement des cellules en modélisant leur environnement tridimensionnel. Nous souhaitons construire des matrices extracellulaires synthétiques modulaires avec des objets fonctionnels compatibles. Il s'agit de comprendre comment la structure du gel (taille des pores, hétérogénéité, propriétés dynamiques.) peut influencer les comportements cellulaires, en particulier la diffusion des nutriments et des gaz. Afin d'optimiser la formation d'un tissu cartilagineux, les matrices synthétiques seront couplées à des cellules ayant un potentiel de différenciation chondrogénique. De précédentes études ont montré que l'hydrogel d'hydroxypropyl méthyl cellulose silanisé (HPMC-Si) permettait la prolifération de chondrocytes. Néanmoins, cet hydrogel nécessite d'être renforcé par des nanoparticules ou en l'associant avec un autre polysaccharide pour en améliorer ses propriétés mécaniques. La biocompatibilité de ces renforts a été testée in vitro afin de limiter le nombre de conditions à tester chez l'animal. Par ailleurs, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) apparaissent comme une source prometteuse de cellules capables de se différencier en chondrocytes. Il paraît important d'étudier in vivo la capacité chondrogénique de l'association des CSM induites in vitro avec des biomatériaux. Ces premiers essais de biofonctionnalité en sous cutané chez la souris avec et sans cellules seront réalisés afin d'établir la preuve de concept. Une analyse des propriétés mécaniques et de l'expression des marqueurs chondrogéniques au niveau transcriptionnel (par PCR) et au niveau traductionnel (par immunohistochimie). Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, les explants utilisés pour l'analyse mécanique seront ensuite étudiés en immunohistochimie. Afin de pouvoir réaliser une analyse statistique de nos résultats, nous devons faire 4 implants par condition et par délai pour chaque type d'analyse (PCR et histo/méca). Cette étude comporte 6 conditions et 3 délais, 72 souris seront donc nécessaires.

Des études préliminaires in vitro ont été réalisées afin de limiter le nombre de biomatériaux à tester et donc le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, plusieurs types d'analyses (analyse biomécanique et immunohistochimique) seront réalisés sur le même échantillon ce qui diminuera aussi le nombre d'animaux nécessaires à l'étude. En ce qui concerne la douleur des animaux, les souris seront observées quotidiennement par du personnel de l'animalerie. Si toutefois un signe de mal être ou de douleur est observé, les animaux recevront une dose d'analgésique (buprénorphine). En cas de douleur non contrôlée, l'animal sera euthanasié pour des raisons éthiques.

Par ailleurs, au niveau du raffinement, les animaux seront hébergés dans des cages adaptées en fonction de la taille et du nombre d'animaux. De plus, les souris Nude sont placées dans une salle spécifique de l'animalerie.

8058 Les inhibiteurs de la résorption osseuse tels que les bisphosphonates sont largement utilisés en clinique pour traiter les pathologies induisant une lyse osseuse. Chez l'enfant le premier effet secondaire de ces inhibiteurs est un arrêt de la croissance de l'ensemble des unités squelettiques.

La principale difficulté dans l'analyse de cet effet pervers est le défaut de modèle animal adapté aux études pédiatriques, plus précisément d'un modèle murin de pathologie ostéolytique (source de la prescription d'inhibiteur de la résorption) compatible avec une analyse des effets des inhibiteurs pendant la croissance.

Nous disposons de plusieurs lignées de souris développant des maladies ostéolytiques tardives. Les souris invalidées pour l'ostéoprotégérine (OPG^{-/-}), inhibiteur de la différenciation et de l'activation des ostéoclastes, développent une ostéoporose à l'âge adulte. Les souris transgéniques sur-exprimant RANK (RANK-Tg), récepteur clef de la différenciation ostéoclastique, constituent un modèle d'ostéolyse excessive adulte d'origine génétique. Les premiers croisements réalisés entre ces deux lignées (souris OPG^{-/-} RANK-Tg) ont généré une souris présentant une ostéolyse juvénile sévère.

L'objectif du projet présenté est de traiter ces doubles mutants et les contrôles simples mutants et non-mutants sur différentes périodes pédiatriques avec plusieurs inhibiteurs de la résorption osseuse séparément ou conjointement, deux bisphosphonates (le clodronate et le zolédronate) et deux inhibiteurs du facteur de différenciation ostéoclastique RANKL (l'anticorps neutralisant IK22.5 et de l'ostéoprotégérine recombinante), et d'analyser les impacts et les effets secondaires sur l'ensemble du squelette.

Cette étude sera réalisée en application de la règle des 3R (remplacer, raffiner, réduire) sachant que ces expérimentations ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations sur des cultures de cellules, les aspects développement et pathologie systémique nécessitant de travailler sur le corps entier. D'autre part, les expérimentations seront conduites dans un souci de prise en charge du bien-être animal, avec l'enrichissement des conditions de vie des souris, et la prise en charge de la douleur (expérimentations avec procédure légère). Enfin, le nombre d'animaux inclus dans l'étude est réduit au minimum (240 au total correspondant aux 5 souriceaux par conditions nécessaires pour valider des résultats statistiquement significatifs).

8059 L'infection à *Mycobacterium ulcerans*, est une maladie négligée émergente. Cette infection, qui touche principalement les enfants, est diagnostiquée principalement dans les zones humides de l'Afrique de l'Ouest et Centrale. Les lésions débutent généralement par un nodule qui évolue en une ulcération que s'étend dramatiquement. Malgré leur étendue, les lésions ne sont pas douloureuses. Chez l'homme, lorsque les lésions ne sont pas traitées, elles peuvent évoluer vers un processus spontané de cicatrisation. Cette capacité à contrôler l'infection naturellement est un processus dont les mécanismes impliqués doivent être disséqués afin d'envisager de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il y a deux ans, nous avons rapporté que des souris FVB/N, inoculées par *M. ulcerans* présentaient des lésions identiques à celles observées dans les souches C57Bl/6 et Balb/c, mais évoluent vers une cicatrisation.

Nos études antérieures montrent que chez les souris FVB/N il y a une polarisation des macrophages en macrophages réparateurs. Cette polarisation serait initiée par un métabolisme que seules les FVB/N dans un contexte d'infection à *M. ulcerans* soient capables de mettre en place. En effet nos études suggèrent que chez les FVB/N il y a un métabolisme des acides gras formant des corps céto-gènes. Récemment nos collègues ont montré que la formation de corps céto-gènes favorisait l'émergence de macrophages réparateurs. De plus des observations réalisées par l'équipe médicale avec qui nous collaborons suggèrent que les patients (présentant des lésions à *M. ulcerans*) qui lors de leur hospitalisation ont un régime enrichi en acides gras cicatrisent plus facilement.

Dans ce contexte et compte tenu de nos résultats antérieurs (in vivo et in vitro), nous nous proposons d'étudier l'impact d'un régime céto-gène sur l'infection à *M. ulcerans*.

Un nombre total de 100 souris sera nécessaire à ce projet. Cette étude a été rédigée et pensée de manière à respecter la règle des 3 R (Remplacement, Réduction, Raffinement).

Le bien-être animal a été une des priorités dans la conception de cette étude mais nous ne pouvons à ce stade nous passer d'utiliser des animaux, c'est pourquoi nous n'utiliserons que le nombre d'animaux nécessaires pour mener à bien cette étude et tous les résultats obtenus seront utilisés et exploités.

Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'anxiété qu'elles pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté. Un suivi régulier sera effectué sur l'ensemble des animaux et des indicateurs comportementaux et physiques sont prédéfinis et constituent les points limites. Pour éviter toute souffrance lors du protocole expérimental, un anesthésique volatil (isoflurane) pourra être utilisé. Ce projet s'inscrit ainsi dans une gestion éthique de l'expérimentation animale et, est donc en accord avec les réglementations européennes et françaises de bonnes pratiques de laboratoire.

8060 La radiothérapie est un outil incontournable dans la prise en charge thérapeutique des cancers. La principale difficulté dans la mise en place des protocoles de radiothérapie est de cibler la tumeur tout en épargnant au maximum les tissus sains environnants. Ces tissus sains irradiés sont responsables

du développement de séquelles aiguës (dans les semaines suivant la radiothérapie) et/ou tardives (des mois voire des années après la radiothérapie). La société doit aujourd'hui faire face à plusieurs évolutions particulièrement rapides ces dernières années dans le contexte de la radiothérapie qui amènent des questions nouvelles dans la prise en charge et le suivi des patients cancéreux : 1) la prise en charge du cancer est de plus en plus efficace, les patients survivants du cancer ont une espérance de vie longue, ce qui les expose au risque de développer des séquelles tardives ; 2) les progrès techniques et balistiques (ciblage de la tumeur) réduisent globalement le volume de tissus sains irradiés et donc les effets secondaires, mais exposent les patients à de nouveaux types de protocoles, en particulier à des escalades de doses, des modifications de débit de dose, de type de rayonnement, d'énergie, ou des protocoles de fractionnement de dose sur lesquels il existe encore peu de recul clinique en ce qui concerne les dommages aux tissus sains ; 3) il est encore aujourd'hui impossible de prédire le risque de dommages aux tissus sains lors de l'application de ces nouveaux protocoles.

Un des objectifs de notre équipe est de mettre en place un modèle in vitro de prédiction du risque de séquelles tardives lors des changements de protocole en radiothérapie. L'objectif du projet est donc de valider in vivo chez la souris les observations faites in vitro et de déterminer si ces mesures multiples in vitro pourraient, lors de l'utilisation d'un nouveau type de rayonnement pour traiter les patients, prédire un risque associé.

Nous exposerons des souris C57BL/6J à deux types de rayonnements X ayant des énergies différentes : un rayonnement de 220 kV et un rayonnement de 4 MV, chaque rayonnement ayant un débit de 2,5 Gy/min. Pour chaque type de rayonnement, nous utiliserons deux modèles d'irradiation différents : une irradiation corps entier et une irradiation localisée sur le rectum.

L'irradiation corps entier nous permettra de mettre en évidence si un changement d'énergie peut modifier la sévérité des atteintes hématopoïétiques et digestives aiguës après exposition à forte dose. L'irradiation localisée du rectum nous permettra de savoir si l'énergie du rayonnement influence la sévérité des lésions digestives tardives.

Les modèles d'irradiation sont sévères mais justifiés car reproductibles, très décrits dans la littérature radiobiologique et maîtrisés par le laboratoire, et permettent une mise en évidence rapide d'une différence de sévérité d'atteinte en fonction de l'énergie du rayonnement. Le nombre total de souris utilisées pour ce projet sera de 112. La validation des résultats obtenus in vitro nécessite de passer par l'expérimentation animale. Les modèles utilisés sont connus et le nombre d'animaux pour chaque test optimisé pour obtenir des résultats statistiquement robustes tout en évitant d'utiliser un nombre trop important d'animaux. Enfin, les animaux sont suivis quotidiennement (plus si nécessaire) et des décisions d'euthanasie anticipée sont prises en cas de souffrance et d'inconfort sévère des animaux irradiés. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (mise en place de grilles de score, suivi des animaux, anesthésie pour les irradiations, hébergement en groupe avec enrichissement).

8061 Le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals), exige que les industriels et les importateurs démontrent qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils souhaitent mettre sur le marché. Si des essais expérimentaux s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests à utiliser s'appuient sur les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE). Ainsi, pour des substances fabriquées ou importées en quantités égales ou supérieures à 10 tonnes (Annexe VIII du règlement REACH), des informations issues d'une étude de toxicité à court terme par administration répétée (28 jours) et du test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement sont exigées.

Cette demande porte sur la réalisation d'études combinées de toxicité à doses répétées et du dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement (ligne directrice (LD) OCDE n°422). L'objectif de ces études est de déterminer les effets de substances chimiques sur l'organisme de manière générale, ainsi que sur les fonctions de reproduction (fonction gonadique, accouplement, conception, développement embryonnaire et mise bas). Les résultats obtenus doivent également contribuer à déterminer des valeurs toxicologiques de référence pour les substances testées, et à obtenir des indications sur le potentiel de perturbation endocrinienne, ainsi que sur les effets cognitifs et immunotoxiques des substances.

Lorsqu'aucune donnée toxicologique sur une substance ne sera documentée, une « étude d'orientation » sera réalisée dans un 1er temps, dans le but de définir les doses à tester dans l'étude combinée. Elle consistera en un traitement quotidien pendant 14 jours, par voie orale, de rats mâles et femelles, à quatre niveaux de doses (de 0 à la dose limite de 1000 mg/kg/j, tel que défini par l'OCDE). Dans le cadre de l'étude combinée, les animaux sont mis en reproduction et seront traités par voie orale quotidiennement de 28 à 77 jours (durée variable selon le sexe et le moment de mise bas des jeunes). Les signes cliniques, et une éventuelle morbidité et mortalité seront quotidiennement observés. Les performances cognitives des animaux de la génération parentale seront évaluées grâce à une batterie de tests fonctionnels. Les petits seront de même observés selon la LD422 (suivi du poids corporel, sexage.) pour évaluer les éventuels effets des substances testées. Après euthanasie, un examen macroscopique, ainsi que des analyses biochimiques, hématologiques et histologiques complètes (selon la LD422) seront réalisés.

Une étude d'orientation nécessite 24 animaux et une étude combinée nécessite 96 animaux. Nous prévoyons de réaliser 5 études complètes sur 5 ans (1 par an), soit un nombre maximum de 600 animaux. A la fin de l'étude, les rats adultes et les jeunes de plus de 10 jours seront euthanasiés par une injection intrapéritonéale de pentobarbital sodique à usage vétérinaire selon la posologie appropriée. Les jeunes animaux de moins de 10 jours sont anesthésiés par inhalation d'isoflurane, puis euthanasiés.

La LD 422 constitue une alternative à la réalisation de deux autres LD de l'OCDE (évaluation de la toxicité orale à doses répétées [LD 407] et de la toxicité pour la reproduction et le développement [LD 421] des substances chimiques), qui répond aux principes de réduction et de raffinement (plus petit nombre d'animaux et optimisation de la quantité d'informations obtenues)

Durant les études, le bien-être des animaux sera assuré par des enrichissements de leur milieu : un fond sonore musical et du matériel de nidification sera mis à disposition des animaux. Le remplacement de l'expérimentation animale dans le cadre des études de toxicité à doses répétées n'est pas applicable du fait de l'absence de méthodes alternatives permettant de déterminer des valeurs de référence et d'évaluer les effets de l'exposition périnatale aux substances chimiques.

8062 Le développement constant des technologies de télécommunication a pour conséquence l'augmentation de l'exposition des populations aux champs électromagnétiques radiofréquence (CEM-RF). Les potentiels effets sanitaires des expositions quotidiennes aux CEM-RF sont une préoccupation sociétale, de la communauté scientifique et gouvernementale. Une étude a montré que l'utilisation des téléphones sans fil était liée à un accroissement du risque de décès chez les patients atteints de cancer du cerveau.

L'objectif de ce projet est de reproduire expérimentalement ce résultat pour démontrer que l'exposition aux CEM-RF est la cause de la diminution de durée de vie. L'effet potentiel des expositions répétées aux CEM-RF du téléphone portable (GSM 900 MHz) sera testé sur la taille des tumeurs et sur la survie. Les modèles in vitro de culture cellulaire ne permettent pas la mesure de la survie d'un organisme. De plus, les effets biologiques des CEM-RF sont différents lorsqu'ils sont appliqués à des cellules isolées ou à un organisme entier. Par exemple, les fonctions physiologiques d'adaptation comme la thermorégulation sont difficilement transposables dans des modèles in vitro. Pour résoudre cette question il sera donc nécessaire d'utiliser l'expérimentation in vivo.

Au total, 336 rats seront greffés avec des cellules cancéreuses. Le nombre d'animaux utilisé pour mener à bien ce projet sera réduit au strict minimum pour pouvoir conclure de façon statistiquement significative. La survie et la taille des tumeurs seront mesurées après des expositions répétées aux CEM-RF au signal GSM 900MHz. Les niveaux de CEM-RF (débit d'absorption spécifique (DAS, niveau d'énergie absorbée)) seront environnementaux. Des prélèvements sanguins permettront le suivi de marqueurs de l'état de santé des rats durant la période des expositions aux GSM. La taille et la morphologie des tumeurs seront analysées par l'histologie. Tous les animaux seront suivis quotidiennement pour la souffrance avec un traitement analgésique. Ce travail permettra d'apporter des éléments scientifiques pour évaluer la dangerosité des CEM-RF du téléphone portable sur les cancers du cerveau.

8063 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, certaines donnant naissance à des génomes défectifs, qui constituent des particules défectives interférentes (DIP). Des études en culture cellulaire ont démontré que l'infection virale est atténuée lorsque la proportion de DIP est élevée. Des génomes défectifs produits et encapsidés *in vitro* seront donc susceptibles d'interférer avec le virus entier après administration chez l'individu - ce qui constituerait une nouvelle approche antivirale.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de déterminer si cette approche, qui est prometteuse en culture cellulaire, peut protéger contre l'infection. Il serait également nécessaire de déterminer les conditions d'administration idéales pour avoir l'effet antiviral désiré- la dose, la voie d'administration, le temps de traitement. Seules les DIPs les plus performantes en culture cellulaire seront caractérisées chez l'animal. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles ou mâles âgées de 5 à 6 semaines. Un maximum de 1220 souris C57BL/6 sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 5 pour chacun des procédures expérimentales et de temps d'analyse (3 temps : 3, 5 et 7 jours post-infection). En tout, 5 procédures expérimentales seront réalisées, qui seront répétées un maximum de trois fois et 1 procédure répétée jusqu'à 6 fois, dont le degré de sévérité est léger à modéré.

Nous allons étudier l'innocuité du traitement (administration des DIPs sans infection) et l'effet antiviral des DIPs contre l'infection par le virus Chikungunya. L'infection est asymptomatique pendant les premiers 6 jours. Les souris seront suivies quotidiennement pendant les 7 jours d'infection. Nous utilisons un modèle murin bien caractérisé. Il n'est pas nécessaire d'attendre que l'infection ne devienne symptomatique (début de l'inflammation à 6 jours, car la charge virale maximale est atteinte à 5 jours après infection, avant que les symptômes progressent). L'effet protecteur des DIPs peut donc être évalué avant ce stade. Les souris seront mises à mort avant le prélèvement d'organes pour déterminer la charge virale.

8064 Le système nerveux des mammifères est constitué du système nerveux central, le cerveau et la moelle épinière, et du système nerveux périphérique (SNP), les nerfs qui parcourent le corps. Le SNP est essentiel pour distribuer aux muscles et aux différents organes les informations transmises par le cerveau mais aussi pour faire remonter les informations sensorielles collectées par les organes des sens. Le SNP est composé de deux types cellulaires principaux, les axones de neurones périphériques moteurs et sensitifs et les cellules de Schwann, les cellules gliales du SNP. Les cellules de Schwann entourent et forment une gaine isolante, protectrice et nutritive autour des axones, la gaine de myéline. La plupart des maladies de ce système sont dues à des problèmes dans la maintenance des interactions cellulaires étroites qui existent entre les axones et la myéline.

Les neuropathies du nerf peuvent provenir de défauts de l'axone ou de la myéline. Elles sont d'origines génétiques, les maladies de Charcot-Marie-Tooth (CMT), les plus communes de maladies rares, ou bien acquises, comme la neuropathie diabétique ou le syndrome de Guillain-Barré. Toutes ensemble ces maladies du nerf représentent un nombre considérable de malades en France et dans le monde. A l'heure actuelle il n'existe aucune thérapie spécifique pour ces maladies.

Notre laboratoire a acquis une solide expertise dans la biologie du nerf périphérique et dans les maladies du nerf. Ce projet est destiné à poursuivre notre étude des mécanismes moléculaires qui sont mis en jeu dans la mise en place des structures nerveuses et surtout dans leur maintenance. Il est aussi destiné à développer des approches de thérapie génique et pharmacologique pour le traitement des maladies du nerf et à faire des tests précliniques chez le petit rongeur.

L'étude du SNP est compliquée par l'existence de relations très étroites entre les cellules gliales et les axones et étudier le système dans des modèles expérimentaux qui n'incluent pas ces interactions n'a pas vraiment d'intérêt. Or ces interactions sont difficiles à reproduire *in vitro*. Il existe un système de délicates co-cultures avec des cellules de Schwann et de neurones qui permet d'obtenir de la myéline. Mais malheureusement cette myéline reste incomplète et immature ce qui empêche d'analyser ce qu'il se passe lors des maladies de la maintenance de la myéline. Il n'existe donc pas à l'heure actuelle d'alternative à l'étude du système dans l'animal.

Chez l'animal la principale approche est la création de souris et de rats transgéniques et knock-out. Cette approche a permis la création de nombreuses lignées et modèles rongeurs de maladies du nerf. Cependant cette approche est longue, fastidieuse, couteuse en argent et en nombre d'animaux. On estime qu'il faut utiliser 20 souris pour produire et utiliser une souris modifiée génétiquement. Nous

avons cherché à réduire ces inconvénients en utilisant une approche de transgénèse virale qui permet de modifier les cellules d'intérêts sans modifier tout l'animal. A partir de cette approche nous en avons développé d'autres qui exploitent la facilité et la versatilité de cette transgénèse sur un nombre limité de cellules. Ainsi nous pouvons imager dans l'animal vivant des cellules et des organelles comme les mitochondries rendu fluorescent grâce à l'expression de sondes fluorescentes par l'intermédiaire des virus. Au-delà de la réduction du nombre d'animaux par rapport à la méthode de modification génétique, la transgénèse virale permet de remplacer et de raffiner l'approche transgénique car 1- elle est très spécifique : on cible et on analyse uniquement les cellules du nerf qui nous intéressent et 2- elle atteint relativement peu de cellules dans le nerf (10 à 20% des cellules cibles). Tout effet systémique nocif ou douloureux résultant de la transgénèse génétique totale est ainsi évité.

Nous envisageons d'utiliser 1040 animaux (840 souris et 200 rats).

Ces travaux nous permettront de mieux comprendre l'origine du processus de dégénération de la myéline et de mort axonale et nous espérons pouvoir ainsi proposer de nouvelles thérapies pour ces maladies.

8065 La thrombose peut être définie comme la formation d'un caillot (thrombus) dans un vaisseau sanguin conduisant à son obstruction. Ce caillot est la résultante d'une adhésion dérégulée entre les cellules sanguines et les cellules endothéliales tapissant la paroi interne des vaisseaux sanguins. Les thromboses (infarctus du myocarde, accident vasculaire cérébral, embolie pulmonaire, ...) sont les principales causes de décès dans les pays industrialisés. Toutefois, la physiopathologie de la thrombose n'est pas encore totalement élucidée et il existe une proportion importante de personnes pour lesquelles on ne comprend pas pourquoi la thrombose est survenue.

Dans le cadre de ce projet de recherche, notre objectif est de mieux comprendre le processus thrombotique afin de mieux détecter et traiter les patients mais également d'éviter la récurrence. Notre équipe s'intéresse particulièrement à une famille de maladies hématologiques où les patients ont un risque important de développer des thromboses. Ces patients sont porteurs d'une protéine mutée nommée JAK2V617F, au sein d'une ou plusieurs population(s) de cellules sanguines. Des travaux récents ont révélé la présence de la mutation JAK2V617F dans les cellules endothéliales suggérant qu'elles étaient un facteur clé dans la survenue de la thrombose. Dans une optique de remplacement de modèles in vivo, nous avons réalisé des études conceptuelles in vitro mais également en conditions de flux (c'est-à-dire mimant au plus près un vaisseau sanguin). Nous avons pu démontrer que les cellules endothéliales JAK2V617F sont suractivées, qu'elles prolifèrent plus et qu'elles font plus adhérer certaines cellules sanguines. Nous avons aussi pu mettre en évidence le caractère pro-thrombotique d'une sous-population des cellules sanguines : les polynucléaires neutrophiles.

Ces résultats ouvrent la voie à l'étude des interactions cellules sanguines /cellules endothéliales dans un modèle plus complexe mimant notre système sanguin humain. Pour cela, nous souhaitons induire la thrombose chez différentes souches de souris portant la mutation JAK2V617V au sein des cellules sanguines et/ou endothéliales.

Dans la conception de ces études, nous avons été particulièrement attentifs au bien-être des animaux et au respect de la règle des 3R.

Concrètement, la durée de notre projet est estimée à deux ans au cours desquels nous allons générer les animaux transgéniques (issus de fournisseurs agréés ou de collaborateurs) et réaliser les expérimentations d'induction de la thrombose.

En règle générale, nous nous placerons dans une phase précoce de la maladie chez les souris mutées afin de limiter les effets secondaires délétères que nous évaluerons sur 5 portées de chaque souche de souris.

La thrombose sera ensuite déclenchée grâce à l'injection de deux inducteurs utilisés à des doses non létales : le Lipopolysaccharide-LPS (Classe modérée) ou un mélange collagène/épinéphrine (Classe légère). Ces deux modèles sont bien décrits dans la littérature scientifique, cela nous a permis d'estimer au plus près le nombre d'animaux nécessaires afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables. Ces inducteurs sont connus pour préserver l'intégrité des cellules endothéliales ce qui est indispensable à notre étude. Après 24h (LPS) ou 3 minutes (Collagène/épinéphrine), les animaux

seront anesthésiés puis mis à mort afin de prélever les organes et produits sanguins d'intérêts dans le but de réaliser les analyses histologiques, sanguines, ex vivo, etc..., que nous avons planifiées.

Les deux inducteurs de thromboses combinés aux différentes souches de souris à notre disposition vont nous permettre de couvrir une grande partie des facteurs impliqués dans la thrombose. Il nous suffira alors de faire varier l'un des paramètres (par exemple mutation JAK2V617F uniquement au niveau des cellules endothéliales) pour comprendre son importance dans la survenue de la thrombose. Nous souhaitons également étudier le rôle de deux traitements utilisés chez l'homme, mais dont les mécanismes sont encore mal compris. Ceci explique le nombre d'animaux que nous souhaitons utiliser dans cette étude. Il s'élève à 1564 souris, plus 72 géniteurs et 2596 animaux n'ayant pas le génotype d'intérêt, soit 4232 souris.

Afin de réduire, le nombre d'animaux à utiliser, nous avons réalisé une solide bibliographie grâce à laquelle nous avons pu déterminer le nombre d'animaux minimum par groupe, les tests statistiques à utiliser et les souches de souris les plus pertinentes à utiliser. De plus, à partir d'un seul animal, nous allons générer différents échantillons (organes, sang, plasma). En complément, nous allons travailler de façon séquentielle, c'est-à-dire que le passage à l'étape suivante est conditionné par l'obtention de résultats probants. De la même façon, afin de limiter la souffrance des animaux, nous allons travailler avec des doses croissantes d'inducteurs de la thrombose. Lors de chaque expérience, les animaux seront systématiquement anesthésiés avant l'induction de la thrombose et la douleur éventuellement générée sera limitée par administration d'antalgique. Nous avons mis en place une échelle de jugement de la douleur, ainsi que des points limites afin que chaque personne impliquée dans ce projet puisse mettre, le plus rapidement possible, la réponse adaptée dans le but de limiter la souffrance des animaux.

De façon générale, les animaux seront hébergés dans une animalerie agréée sous la responsabilité de personnes disposants de la formation adéquate et les expérimentations seront réalisées dans des pièces dédiées. Nous utiliserons des mâles et des femelles adultes ne présentant pas de phénotype délétère. Des lots de 6 animaux par cage seront constitués et ils resteront ensemble tout le long de l'expérimentation. La litière est une litière enrichie, propre et adaptée pour l'hébergement des animaux ; les souris peuvent la « dérouler » afin de former des nids protecteurs et utiliser des igloos pour s'isoler. Les animaux seront nourris avec un régime adapté aux souris d'élevage et l'eau est ad libitum.

Au terme de ces deux années d'études, nous pourrons donc décrypter de façon très complète le rôle des cellules sanguines et des cellules endothéliales dans la physiopathologie de la thrombose. Mais également, nous pourrons évaluer l'efficacité des traitements en cours ainsi que celui de nouvelles thérapeutiques.

8066 La leptospirose est une zoonose due à une bactérie spiralée et mobile *Leptospira interrogans*. Ce pathogène est transmis par les rongeurs qui les hébergent dans leurs reins, sans symptômes, et les excrètent via les urines dans l'environnement. L'homme peut être infecté par contact des leptospires avec la peau ou les muqueuses et développer une maladie sévère pouvant atteindre les organes vitaux et entraîner la mort. Il n'existe pas de vaccins efficaces, et les antibiotiques ne sont actifs chez l'homme qu'au début de l'infection. Depuis peu, la chronicité de la maladie est suspectée chez l'homme. En raison du réchauffement climatique et de l'urbanisation croissante dans des conditions sanitaires insuffisantes, la leptospirose est une maladie ré-émergente.

Notre travail a montré que les souris constituaient un excellent modèle pour étudier la leptospirose aiguë, reproduisant la maladie humaine ou la leptospirose rénale chronique, habituellement étudiée chez le rat.

Nous disposons de leptospires (*Leptospira interrogans*) bioluminescents qui représentent de nouveaux outils permettant d'étudier la leptospirose, chez la souris vivante, en suivant dans le temps l'infection par imagerie (IVIS). Nous proposons d'étudier, grâce à ces leptospires bioluminescents, la transmission de la maladie au sein d'un groupe de souris, l'infection via la peau et les muqueuses et les conséquences de l'infection rénale, qui sont mal connues. Par ailleurs, nous testerons certains traitements et candidats vaccins.

Ces travaux devraient permettre de mieux comprendre le mode de transmission et les premières étapes de l'infection, et de caractériser les conséquences, pour l'instant inconnues, de l'infection rénale chronique. De plus, nous testerons de nouvelles stratégies thérapeutiques ou vaccinales indispensables pour lutter contre la leptospirose.

Ce projet de recherche fondamentale et translationnelle de 5 ans utilisera jusqu'à 1698 souris. Les souris seront utilisées dans des procédures de degré de sévérité léger ou modéré car nous utiliserons une dose infectieuse résultant en une infection asymptomatique, non douloureuse, et que l'imagerie se fait sous anesthésie gazeuse. Dans le cas d'une dose infectieuse qui provoquerait une septicémie, l'observation et le suivi quotidien des souris et le degré de bioluminescence de la souris constituent des points limites prédictifs qui nous permettront de mettre à mort les souris pour d'anticiper et d'éviter leur souffrance.

L'imagerie du petit animal vivant permet de réduire considérablement le nombre de souris utilisées. Cependant tout sera mis en œuvre dans ce projet, pour réduire le stress, limiter la souffrance et le nombre de souris, tout en obtenant des résultats statistiquement significatifs et exploitables. Ainsi nous utiliserons des groupes de 4 souris qui dans la plupart des cas ne seront pas séparées au cours de la procédure et qui seront manipulées par le même expérimentateur. De plus, seules les expériences donnant des résultats intéressants seront répétées. L'étude de la leptospirose implique un hôte et les bactéries qui l'infectent. La complexité de cette interaction ne peut pas être appréhendée dans sa globalité *in vitro*. La souris, hôte naturel asymptomatique, est idéale pour pouvoir mieux comprendre la leptospirose.

8067 Les eaux marines côtières sont soumises à deux sources de variabilité physico-chimique, l'une naturelle (e.g. saisonnière, tidale, météorologique...) l'autre résultant des activités anthropiques (e.g. eutrophisation, contamination, changements climatiques...). Ces sources de variabilité combinent leurs effets et affectent, de manière plus ou moins prévisible, les caractéristiques abiotiques (e.g. salinité, température, oxygénation) mais également biotiques (e.g. prédateurs proies) de l'habitat des organismes marins. Face à cette variabilité environnementale, les poissons disposent de capacités d'ajustement importantes, tant physiologique, que morphologique, que comportementale, préservant ainsi leur capacité à exploiter les ressources présentes dans leur environnement. L'analyse de la littérature montre que les auteurs ont considérés la relation poisson-milieu essentiellement sous l'angle de la physiologie, laissant de côté les aspects morphologiques et comportementaux. L'objectif du présent travail vise à améliorer notre compréhension de la relation poisson-milieu en développant le volet comportemental.

Quelques soient les traits étudiés, qu'ils soient physiologiques, morphologiques ou comportementaux, on note généralement une forte variabilité interindividuelle au sein des populations de poissons. Cette diversité phénotypique est une des composantes de la résilience des populations à la variabilité environnementale. En effet, face à une même perturbation, un groupe d'individus est ainsi susceptible d'exprimer une large palette d'ajustements comportementaux, favorisant ainsi l'émergence d'une réponse adaptée garantissant la pérennité de la population. A titre d'exemple, des animaux téméraires vont plus profiter des opportunités (e.g. ressource alimentaire, abri, habitat) présentes dans leur environnement mais seront également plus sujet à la prédation. En revanche, les animaux moins téméraires profiteront moins de opportunités pouvant s'offrir mais seront également moins soumis à la prédation.

Les activités anthropiques sont à l'origine de nombreuses perturbations environnementales. Parmi celles-ci les rejets accidentels d'hydrocarbures ont des impacts qui restent mal évalués tant sur le plan économique qu'écologique. Chaque année plus d'un milliard de litres d'hydrocarbures sont rejetés dans les océans, majoritairement en relation avec la production de pétrole, son transport et son utilisation. De nombreuses études ont examinés les effets des hydrocarbures sur la physiologie des poissons. En revanche, très peu d'études ont examiné leurs effets sur les performances comportementales. Les quelques études disponibles suggèrent pourtant qu'une exposition à des hydrocarbures est susceptible d'altérer la capacité des animaux à percevoir les stimuli environnementaux affectant ainsi l'étendue de leur registre comportemental (e.g. distribution, migration, relation prédateur/proie). Parmi les comportements écologiquement importants, des études ont montrées que le comportement social (sociabilité) présente une forte variabilité interindividuelle et

semble être le trait de caractère le plus sensible aux variations environnementales ou à l'état physiologique (e.g. jeûne). La sociabilité est particulièrement pertinente chez notre modèle biologique (*Dicentrarchus labrax*), les juvéniles de cette espèce vivant en groupe.

En cas d'une marée noire, une des stratégies de réponse est l'utilisation de dispersants chimiques pour le traitement de la zone touchée. Mais les répercussions d'un tel traitement ne sont pas encore bien évaluées, cela pourrait notamment augmenter la biodisponibilité du pétrole. Aussi leur utilisation reste controversée.

Une étude précédente faisant l'objet de deux projets a permis de mettre en évidence un effet de léthargie et une altération de la perception du risque chez des juvéniles de bar suite à une exposition à des hydrocarbures pétroliers dispersés chimiquement. Aussi, un rétablissement de ces comportements a été observé en moins de deux semaines post-exposition. Il semble maintenant pertinent de regarder si ces observations sont confirmées au niveau d'un groupe d'individus et si la récupération au niveau comportementale s'inscrit dans la même échelle de temps que la récupération au niveau physiologique.

Dans ce contexte, la présente demande d'autorisation de projet a pour objectif, d'évaluer l'impact d'une exposition à des hydrocarbures pétroliers traités chimiquement avec un dispersant sur : la sociabilité; la réponse d'un groupe d'individus à la simulation d'une attaque de prédateur et le taux métabolique (respirométrie).

Le modèle choisi dans cette étude est le bar européen (*Dicentrarchus labrax*), une espèce importante tant en termes écologique qu'économique.

Cette étude, fait l'objet en parallèle d'une autre demande d'autorisation de projet utilisant des animaux à des fins scientifiques puisqu'elle comprend deux étapes se déroulant dans deux établissements utilisateurs distincts. La première étape qui fait l'objet de l'autre d'autorisation de projet, consiste à exposer les poissons au traitement expérimental : pétrole + du dispersant, dans un établissement possédant des installations expérimentales appropriées. La seconde étape qui fait l'objet de la présente demande d'autorisation de projet est réalisée après transfert des animaux dans le second établissement utilisateur et elle porte sur le suivi temporel des réponses comportementales et physiologique des individus sur une période de 8 jours suivant l'exposition au traitement.

Le projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le projet faisant l'objet de la présente demande s'inscrit dans une étude dont le but est l'analyse de l'expression des traits comportementaux et physiologiques, ce qui implique l'utilisation d'animaux vivants (Remplacement). Le projet mobilisera 304 poissons. Le nombre de poissons a été déterminé par des calculs de puissance statistique reposant sur la mise en œuvre d'analyses de variance. Ce nombre est optimisé afin de permettre la prise en compte de l'étendue de la variabilité interindividuelle naturelle (Réduire). En outre, afin de réduire un stress potentiel lors des transports les animaux seront maintenus à jeun et légèrement sédatisés, un minimum de 6 heures sans manipulation sera respecté afin de les laisser récupérer du transport et de la légère sédation. Tout transfert se fera à l'épuisette, afin de bien les prendre sans aucune douleur et les poser délicatement dans un nouveau bassin (Raffiner).

8068 L'œsophagectomie est une intervention consistant en une ablation partielle ou totale de l'œsophage. Ce traitement est indiqué en cas de tumeur maligne, parfois bénigne, et plus rarement en cas de détérioration de l'œsophage due à une inflammation ou à une brûlure par absorption de produits caustiques. Cette chirurgie est responsable de 5% de mortalité post opératoire, et 50% des patients sont atteints de complications post opératoires (sténose, fibrose au niveau de l'anastomose, dysphagies, troubles alimentaires) ce qui entraîne une diminution importante de la qualité de vie des patients. Il est donc nécessaire de trouver des solutions alternatives pour remplacer l'œsophage manquant et diminuant ces complications post-opératoires, telles que le développement des matrices œsophagiennes.

L'objectif du projet est d'étudier l'efficacité et la tolérance d'un dispositif œsophagien (sans ensemencement cellulaire, avec ensemencement in vitro, et avec maturation intra-abdominale avant implantation).

Ces études seront réalisées sur animaux vivants, car ce protocole de suivi post opératoire nécessite d'utiliser un animal vivant. Le porc a été retenu car la structure de l'œsophage et sa taille sont très

proches de ceux rencontrés en clinique humaine. Aucune méthode alternative n'est disponible à l'heure actuelle pour ce type d'étude. Ces études vont nécessiter de travailler sur maximum 39 porcs, nombre maximal d'animaux envisagés sur plusieurs sessions étalées sur 5 ans. Les études seront menées en tenant compte des besoins éthologiques des porcs, en limitant leur stress par un hébergement adapté et en les manipulant par du personnel spécialement formé à cette espèce. En post-opératoire, un suivi antalgique et anti-inflammatoire adapté sera mis en place pour compenser l'inconfort lié à la chirurgie. Une alimentation adaptée de type soupe sera aussi proposé.

8069 Le muscle squelettique permet le déplacement du squelette et est responsable de tous nos mouvements comme par exemple, se tenir debout, maintenir la tête droite et respirer. Des blessures musculaires se produisent très fréquemment pendant le sport. La capacité de régénération du muscle squelettique diminue avec l'âge, résultant en une perte de la masse, de la qualité et de la force musculaire. En outre, il existe de nombreuses myopathies affectant sérieusement la qualité de vie des patients. Par conséquent, il est extrêmement souhaitable de comprendre davantage les mécanismes de régulation de la régénération musculaire et d'identifier les moyens permettant de les améliorer.

La capacité de générer des CSPi (Cellules Souches Pluripotentes induites) à partir de cellules somatiques adultes a révélé certains mécanismes de la plasticité cellulaire, c'est à dire leur capacité à changer de destin. Cette capacité à générer des CSPi représente un potentiel énorme pour la découverte de médicaments et la médecine régénérative. Cependant, les mécanismes de régulation de la plasticité des cellules somatiques pendant le vieillissement restent très peu connus ce qui a des conséquences directes sur l'amélioration de la durée et la qualité de vie.

Notre but est d'identifier les mécanismes potentiels qui permettent d'améliorer le processus de régénération musculaire. Nous souhaitons utiliser une souche murine génétiquement modifiée exprimant les gènes requis pour générer des cellules souches pluripotentes induites (CSPi) in vivo (modèle murin reprogrammable, i4F). De plus, nous allons croiser ce modèle avec trois autres modèles de souris pour étudier l'impact potentiel de reprogrammation sur la régénération musculaire. Ce projet pourra également être bénéfique pour les patients atteints de myopathie ou de sarcopénie.

La guérison de lésions musculaires (régénération) est un processus complexe qui requiert les efforts de différents tissus, y compris le système immunitaire. Ainsi pour modéliser précisément les dynamiques et les capacités de régénération du muscle, les expériences requièrent d'être réalisées in vivo. La souris est une espèce régulièrement utilisée pour l'étude de la réparation des lésions musculaires car elle présente l'avantage d'avoir une organisation similaire à celle de l'être humain. De plus, la durée de vie d'une souris est de deux ou trois ans, ce qui est utile pour étudier des processus physiologiques tel que la régénération musculaire chez les individus âgés. Enfin, il existe de nombreux modèles de souris génétiquement modifiées mimant les altérations existantes dans les pathologies humaines (comme par exemple le modèle de souris Dmdmdx- β geo mimant la myopathie de Duchenne).

Nous utiliserons quatre modèles de souris différents et les protocoles qui seront utilisés dans ce projet ont été bien établis et publiés. Aucun de ces protocoles n'a montré d'effets indésirables majeurs sur les souris et nous utiliserons un anesthésique et un analgésique appropriés pour éviter que les animaux ne souffrent. Si les animaux impliqués dans les expériences venaient à souffrir, ils seraient mis à mort par exposition au CO₂ et les échantillons collectés seront utilisés pour une analyse histopathologique. Le projet comporte 6 procédures de sévérité modérées.

Au total, 170 souris seront utilisées pour la totalité du projet. Les effectifs dans chacune des procédures ont été ajustés sur des bases statistiques afin de les réduire tout en assurant une puissance suffisante.

8070 Les traumatismes sont responsables de 10% des décès et de 16% des handicaps dans le monde selon l'Organisation Mondiale de la Santé (2012). Parmi ces 4 millions de morts chaque année, un tiers est directement imputable à un choc hémorragique. De plus, 30% des patients admis en unité de réanimation et soins intensifs à la suite d'un traumatisme développeront un choc septique. Ce risque est directement corrélé à la sévérité du choc hémorragique subi.

Après un choc hémorragique comme lors d'un sepsis, plus de la moitié des patients présente une atteinte neurologique aiguë, facteur de mortalité précoce. Chez une proportion non négligeable des survivants (25-50% à 2 ans, 20% à 5 ans), ces altérations aiguës débouchent sur des séquelles neurologiques et psycho-cognitives à long terme. Bien que le sepsis fasse l'objet de nombreuses recherches scientifiques, les conséquences neurologiques pouvant survenir à la suite d'un double choc traumatique puis septique ne sont pas connues à l'heure actuelle.

Notre projet concerne à la fois la recherche fondamentale et translationnelle. L'objectif est la caractérisation d'un modèle de choc hémorragique à volume constant chez la souris, et en particulier des répercussions sur l'encéphale. Il s'agit d'une étude pilote afin de mettre en place par la suite un projet de recherche combinant le choc hémorragique et le choc septique, et la caractérisation des atteintes neurologiques induites après ce double choc.

Les effets d'un tel enchaînement physiopathologique de double choc sont systémiques et complexes. Une telle complexité ne peut, à l'heure actuelle, être déconstruite et reconstruite de façon viable *in vitro*. Le modèle animal est donc une nécessité afin d'améliorer notre compréhension et les traitements actuels d'une des causes majeures de mortalité et de handicap dans le monde.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins transgéniques ou non, avec un total de 276 animaux sur une période de 1 an, afin de réaliser une procédure expérimentale décrite comme modérée dans la littérature scientifique. Les populations seront adultes avec un âge moyen de 12 semaines, et elles comprendront à la fois des mâles et des femelles afin d'être représentatif de la population générale et de pouvoir extrapoler les résultats. Nous utiliserons en particulier des souris génétiquement modifiées permettant de visualiser plus facilement les cellules immunitaires résidentes du cerveau, et de réduire le nombre d'animaux nécessaires au projet.

Nous mettrons en œuvre pour chaque expérimentation : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, 2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui seront effectuées, 3) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal par une mise à mort, 4) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 5) une valorisation de chaque animal avec un partage des prélèvements par nos différentes équipes de recherche.

8071 L'objectif de cette étude est de comprendre si un candidat vaccin qui se multiplie chez un hôte vertébré peut infecter un moustique et si ce moustique peut à son tour transmettre le virus à un autre hôte vertébré. Le bénéfice attendu de ce projet est de répondre en peu de temps à la question d'une propagation possible d'un candidat vaccin via une transmission par un moustique.

Le virus Chikungunya (CHIKV) est un arbovirus transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Le CHIKV a été isolé pour la première fois en Tanzanie en 1952 à partir du sérum d'un patient. Les principaux symptômes de la maladie sont : fièvre, arthralgies et éruptions cutanées. D'autres symptômes tels que troubles digestifs, céphalées, douleurs rétro-orbitales, photophobie, myalgies, nausées et asthénie peuvent également être associés à l'infection. Il n'existe à ce jour aucun vaccin contre cette infection virale.

Nous proposons de tester deux candidats vaccins du CHIKV. Ce sont des virus atténués par modification de leur génome, capables de se répliquer une fois inoculés.

Les femelles moustiques du genre *Aedes* (*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*) doivent piquer un hôte vertébré pour se procurer le sang indispensable à la maturation de leurs œufs. Si le moustique pique un patient en phase de virémie, le virus sera ingéré avec le sang absorbé par la femelle. Après une phase de multiplication, de dissémination du virus dans tous les organes internes du moustique et de transmission le virus présent dans les glandes salivaires sera excrété avec la salive émise par la femelle lors de la pique. Ainsi, un individu sera contaminé par la pique d'un moustique infecté.

Compte-tenu de la propriété des deux candidats vaccins à se répliquer, nous nous posons la question de leur transmission par le moustique.

Des infections expérimentales des deux espèces vectrices ont déjà été réalisées en laboratoire afin d'évaluer les taux d'infection, dissémination (propagation du virus dans les organes internes du moustique) et transmission (émission de salive contenant du virus) de deux candidats vaccin (produits

in vitro) en comparaison au virus sauvage (WT). Les résultats ont montré une différence dans le pourcentage de transmission, entre les deux espèces vectrices.

Ce système artificiel de gorgement, mettant en présence des globules rouges de lapin avec une quantité définie de virus amplifié sur culture cellulaire, ne nous permet pas d'étudier tous les paramètres impliqués dans la réplication et la transmission d'un virus entre 2 organismes vivants.

Nous procéderons à des études in vivo pour évaluer :

- 1) l'infection des souris par des moustiques infectés par les candidats vaccins ou le virus WT
- 2) l'infection des moustiques après prise de repas de sang sur souris infectées par les candidats vaccins ou le virus WT

Cette étude nous permettra également d'apporter des précisions sur la cinétique virale dans la souris en fonction du lieu de piqueur du moustique sur le corps de la souris.

Cette étude ne porte pas sur la réponse immunitaire induite par le vaccin. Cette partie du projet sera réalisée par une autre équipe.

Compte-tenu de la particularité des arbovirus qui se répliquent à la fois dans un hôte invertébré (le moustique) et un hôte vertébré (la souris), l'alternance d'hôte induit des contraintes évolutives, jouant un rôle significatif dans la diversité des populations virales. C'est pourquoi l'étude de l'évolution du virus dans les deux hôtes, moustique et souris, est primordiale pour une bonne compréhension de la transmission vectorielle.

Le nombre total de souris est estimée à : 202 souris, réparties en 3 procédures de sévérité légère.

Notre expertise en entomologie et plus particulièrement, en transmission vectorielle, nous permet d'optimiser les différents paramètres expérimentaux comme le nombre de moustiques à mettre en contact avec une souris (qui tient compte du taux de gorgement et du pourcentage d'infection par ces virus), tout en tenant compte de la gêne occasionnée par les piqures de moustiques chez les souris.

La piqueur des femelles moustiques engendre une légère réaction immunitaire due au contact de la salive injectée par l'insecte au moment de la prise de sang. Par notre expérience, nous ne notons pas de démangeaison cutanée constatée chez les souris piquées.

Le volume de sang prélevé par une femelle moustique lors de la piqueur varie de 2 à 5 microlitres. Cela représente un volume inférieur à 0,3% du volume sanguin total d'une souris adulte, donc sans risque d'anémie.

D'après des études antérieures, l'injection du CHIKV à la souris n'entraîne pas de symptômes dommageables pour l'animal. Les souris seront anesthésiées avant contact avec les insectes. Les animaux seront surveillés tous les jours pour détecter l'apparition ou non, de modification de leur état de santé.

8072 L'imagerie nucléaire dont la tomographie par émission de positons (TEP) est un outil largement utilisé en recherche et en clinique car cette imagerie est réalisée à l'aide de sondes moléculaires spécifiques et suffisamment sensibles pour détecter des processus biologiques à très faible dose. Dans cette optique, le composé développé et testé dans cette étude (64Cu- A-2017) représente une nouvelle génération de dérivés de bactériochlorophylle qui permettent l'imagerie et le traitement de tumeurs solides avec le même composé. La molécule initiale non couplée au Cu64 a montré une accumulation spécifique dans plusieurs modèles tumoraux chez l'animal et est détectable en imagerie par fluorescence.

Le but de cette étude est de démontrer l'efficacité de la molécule 64Cu- A-2017 à se fixer sur des cellules cancéreuses du sein chez la souris femelle lors d'une étude in vivo longitudinale en imagerie μ TEP/ μ TDMX. Le modèle utilisé est celui de l'injection en orthotopique de cellules cancéreuses 4T1 chez la souris femelle adulte.

La règle des 3 R sera respectée dans cette étude.

Raffinement : Les animaux seront placés à plusieurs par cage et leur environnement enrichi avec des tubes en PVC. De plus, les animaux et l'induction et la croissance des tumeurs au niveau du flanc des animaux seront quotidiennement surveillés et mesurés à l'aide d'une grille d'évaluation (état de

stress, niveau de douleur, taille de tumeur, etc.). Les souris seront prises en charge selon le score obtenu avec mise à mort si atteinte des points limites terminaux (par exemple perte de poids limite, de mobilité ou dépassement du volume tumoral limite). Les procédures expérimentales du projet seront réalisées par des personnes habilitées et formées.

Réduction : nous utiliserons 52 souris (40 souris injectées avec les cellules cancéreuses et 12 souris injectées avec du PBS (témoins)), ce qui permettra de réaliser les tests statistiques sur les résultats obtenus (test de Mann Whitney).

Remplacement : des tests in vitro préalables ont été réalisés mais l'objectif de ce travail étant de montrer la fixation de la molécule 64Cu- A-2017 dans les cellules cancéreuses chez la souris, elle ne peut se faire que sur des animaux.

8073 Il est maintenant démontré que des cellules progénitrices, dites « souches », se maintiennent dans le cerveau adulte des vertébrés. Elles sont organisées en zones germinatives locales, capables de générer de nouveaux neurones dans le cerveau mature. Le maintien contrôlé du nombre et de l'activité de ces cellules souches est d'importance fondamentale pour la physiologie cérébrale : ainsi, une déplétion des zones germinatives chez l'homme et le rongeur corrèle avec des troubles de l'humeur (dépression, sensibilité aux drogues de dépendance), et avec les troubles de la mémoire associés au vieillissement, alors que la transformation et l'amplification des populations souches pourraient être à l'origine de tumeurs cérébrales. Le but de ce projet est de comprendre les mécanismes cellulaires et moléculaires contrôlant le maintien des populations de cellules souches dans le cerveau car ces mécanismes restent encore mal connus. Nous utilisons comme modèle expérimental un poisson chez qui, au contraire des mammifères, une large population de cellules souches est maintenue dans le cerveau adulte. Par ailleurs, ces cellules sont de localisation superficielle (au contraire des mammifères où elles sont profondes), permettant une imagerie en temps réel non invasive sur animal vivant, anesthésié. L'avantage majeur d'un tel modèle sera donc de pouvoir combiner une analyse du comportement des cellules souches in vivo dans leur environnement intact chez un vertébré, et ce sans nécessiter d'approches expérimentales invasives. Ce projet nécessite 10 procédures, dont 8 de classe légère, 1 de classe modérée et 1 de classe sans réveil. Le nombre total d'animaux nécessaires à ce projet est de 6308. Nous aurons soin de respecter la règle des 3R grâce aux mesures suivantes :

Remplacement : Le travail sur cellules souches en culture a clairement révélé des comportements cellulaires aberrants jamais observés in vivo, notamment concernant le mode et la fréquence de division. Ces deux paramètres impactent de façon directe le maintien, la déplétion ou l'amplification des populations souches du cerveau. Par ailleurs, l'un de nos buts spécifiques est de comprendre les interactions existant entre les cellules souches et leur environnement. Notre projet nécessite donc une approche in vivo. L'utilisation du poisson permet cependant des approches largement non-invasives puisque les cellules souches peuvent directement être filmées in situ à travers la peau et le crâne de l'animal sans nécessité d'intervention chirurgicale.

Réduction : Toutes nos analyses sur tissu reposent sur des mesures quantitatives obtenues par comptage direct des cellules souches sur cerveau entier ou sur coupes. Ainsi, nous limiterons le nombre d'animaux utilisés aux besoins statistiques de nos analyses. Par ailleurs, le cerveau du poisson adulte, à la différence des modèles « classiques » mammifères, maintient un grand nombre de cellules souches. Utiliser les poissons permet donc d'avoir accès à beaucoup plus de cellules par animal, diminuant d'autant le nombre d'animaux à utiliser.

Raffinement : Pour les manipulations, invasives ou nécessitant une immobilisation, des procédures d'anesthésie seront effectuées. Les animaux sont suivis quotidiennement et des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation par une mise à mort sont définis afin de limiter la souffrance et le mal être des animaux.

8074 Ce n'est que depuis deux décennies à peine, qu'a pu être apportée la démonstration que certaines régions du cerveau adulte des mammifères, l'Homme compris, conservent la capacité de produire de nouveaux neurones tout au long de la vie. Les neurobiologistes s'accordent pour désigner au moins deux régions cérébrales faisant l'objet de la production de nouveaux neurones : l'hippocampe et le bulbe olfactif. Nos travaux portent essentiellement sur la production des nouveaux neurones qui

s'intègrent dans le système olfactif. Ces neurones nouvellement générés prennent naissance dans une zone en arrière du bulbe olfactif et migrent pour atteindre ce dernier. Ils entament leur développement au cours de cette migration et l'achèvent en s'intégrant au sein du bulbe olfactif. Nos connaissances sur les mécanismes qui rendent possible la production de ces nouveaux neurones, sur leurs propriétés et leurs fonctions demeurent encore très parcellaires. Les neurones nouvellement générés dans le cerveau adulte suscitent un intérêt tout particulier sur le plan thérapeutique, dans la mesure où il est envisageable d'entrevoir leur utilisation à des fins réparatrices comme par exemple guider une partie d'entre eux, encore non différenciés, vers des territoires du cerveau en dégénérescence qui caractérisent certaines maladies (maladie de Parkinson, maladie d'Alzheimer). Une connaissance approfondie des propriétés de ces nouveaux neurones (prolifération, régulation, migration, différenciation, intégration fonctionnelle) s'avère dès lors indispensable dans la perspective d'en tirer profit sur un plan thérapeutique. Pour ces raisons, notre projet nécessite l'utilisation d'animaux pour étudier les caractéristiques et la contribution des neurones nouvellement générés dans le cerveau adulte. Un autre volet de notre projet a pour objectif de rendre compte de la capacité des souris à identifier le profil odorant de certaines populations de bactéries. En effet, différentes espèces de bactéries produisent et libèrent une variété de composés volatiles spécifiques. La capacité des souris à détecter ces composés olfactifs bactériens offre la perspective de tests rapides et non invasifs pour identifier la présence de populations bactériennes pathogènes. L'identification de certains composés pourrait avoir valeur de diagnostic. En effet un composé volatil produit par la bactérie responsable du choléra peut être aujourd'hui considéré comme un marqueur biologique de la présence de cette bactérie. De la même façon, trois composés volatiles présents dans l'haleine de patients infectés par la bactérie *Helicobacter pylori* suffisent pour attester de la présence de ce pathogène. 480 souris seront utilisées sur une période de 5 ans dans 3 procédures dont 2 procédures de degré de sévérité légère et 1 procédure de degré de sévérité modérée. Le nombre d'animaux requis a été ajusté au minimum en anticipant l'utilisation de tests statistiques non paramétriques requérant un nombre limité de sujets expérimentaux. Les points limites visant à supprimer ou réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété des animaux ont été définis et seront strictement appliqués dans ce projet.

8075 Le syndrome de Down (SD) est la maladie génétique la plus commune, affectant 1/750 naissances et est causé par la présence d'une troisième copie du chromosome 21. Les signes pathologiques retrouvés chez les patients atteints de SD sont des troubles cognitifs, des malformations craniofaciales, un faible tonus musculaire et des cardiopathies congénitales.

L'amélioration des traitements médicaux et de la prise en charge sociale au cours des soixante dernières années ont permis aux patients de voir leur espérance de vie passer de 12 ans dans les années 1940 à 60 ans aujourd'hui. Cette augmentation de l'espérance de vie a révélé que les patients atteignant l'âge adulte montrent un vieillissement prématuré, c'est à dire que ces adultes possèdent des signes de vieillissement à un âge précoce par rapport au reste de la population. Par exemple, les patients atteints par le SD ont une apparition précoce de maladies neurodégénératives, l'apparition de rides, la perte de cheveux, la ménopause chez les femmes, une augmentation des risques d'infections et des risques mortels liés à l'âge. Actuellement, les raisons de ce vieillissement prématuré ne sont pas élucidées. Ce projet aura pour but d'approfondir les connaissances actuelles sur les processus du vieillissement et d'améliorer la modélisation du SD. En outre, ce projet pourrait permettre de découvrir de nouveaux médicaments afin de pallier le vieillissement, non seulement des malades atteints par le SD, mais aussi pour la population générale.

L'utilisation de modèles murins dans l'étude du SD est requise pour plusieurs raisons :

La plupart des pathologies liées au SD apparaissent lors du développement, un processus qui ne peut pas être complètement reproduit *in vitro*. L'utilisation de souris pour l'étude du vieillissement est aussi nécessaire car c'est un processus complexe et multifactoriel.

Les souris reflètent fidèlement la physiologie et la biochimie humaine puisqu'elles sont des mammifères proches au niveau de l'évolution.

Leur vitesse de reproduction, leur génétique connue et les possibilités de manipulations contrôlées *in vivo* (lorsque cela est justifié) font de la souris un modèle idéal pour la compréhension des mécanismes à l'origine du vieillissement prématuré associé au SD.

Ce projet comporte 2 procédures de sévérité légère. La première consiste à créer deux nouvelles lignées murines qui seront de meilleurs modèles de vieillissement pour l'étude du SD. Ces deux nouvelles lignées seront le résultat de l'accouplement de modèles de souris DS décrits précédemment (Tc1 et Ts65Dn) avec un autre modèle de souris déjà caractérisé montrant un vieillissement prématuré (mTR). Ce dernier est régulièrement utilisé pour modéliser les syndromes du vieillissement humain chez des souris. Par conséquent, nous obtiendrons le modèle de souris Tc1 : mTR et le modèle de souris Ts65Dn : mTR.

La seconde procédure effectuée sera le prélèvement sanguin dans la veine faciale au niveau du sinus rétro mandibulaire d'individus provenant des croisements décrits dans la première procédure. Ceci permettra de mesurer différents marqueurs biochimiques afin d'évaluer le vieillissement des animaux. La procédure sera répétée tous les 3 mois durant toute la vie des souris.

Nos études seront réalisées sur des mâles et femelles sans distinction. La durée de vie et la dynamique du vieillissement dépendent du sexe. C'est pourquoi nous garderons constamment le nombre de mâles et de femelles dans chaque groupe afin d'obtenir des données homogènes et de haute qualité. Comme nous étudions une maladie génétique dans le contexte du vieillissement, le remplacement des animaux est impossible. D'après plusieurs études sur le vieillissement utilisant des modèles murins similaires, nous estimons avoir besoin de 410 souris (lignée Tc1, 205 souris et lignée Ts65Dn, 205 souris) qui seront suivies dès leur naissance.

Afin de réduire au maximum le stress des animaux, leur manipulation sera strictement limitée aux interventions décrites ci-dessus ainsi qu'à leur soin hebdomadaire.

8076 Le choc septique est une conséquence grave des septicémies. La mortalité du choc septique est en moyenne de 50% mais peut atteindre 90% en cas de dysfonction de plusieurs organes comme le cerveau, le rein, le foie, ou le cœur. L'apparition d'une défaillance cérébrale est un élément pronostic majeur. Elle se caractérise par une confusion, une agitation, une somnolence voire un coma complet chez certains patients. L'encéphalopathie septique est associée à une surmortalité (63% en cas de coma) ; elle expose les survivants à un risque de démence 8 fois plus fréquent pendant les 10 premières années après la sortie de réanimation. La physiopathologie de cette maladie implique les différentes cellules constituant le cerveau et notamment les cellules microgliales (cellules immunitaires résidentes du système nerveux central (SNC) qui assurent la protection du réseau de neurones sous-jacent).

Il a récemment été suggéré que les altérations de la barrière hémato-encéphalique (BHE), barrière séparant le sang et le SNC, seraient des dommages essentiels initiant des anomalies fonctionnelles et structurelles cérébrales. Cette barrière participe à un complexe neuro-vasculaire, qui intègre également les cellules endothéliales, les astrocytes et les cellules microgliales.

Dans ce projet, nos objectifs sont :

1. de caractériser « une activation microgliale », c'est à dire un processus complexe qui initierait la neuro-inflammation au cours de processus infectieux généralisés non contrôlés. Dans ce but, nous établirons un modèle expérimental de « choc septique » qui repose sur le recours à des souris transgéniques
2. de caractériser une altération de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique
3. d'évaluer l'impact de molécules pharmacologiques aux propriétés définies sur des cellules microgliales activées
4. d'étudier l'impact de ces altérations sur des lignées de souris prédisposées aux maladies neurodégénératives

Ces différents axes de recherche seront explorés chez des souris de laboratoire aux phases très précoces mais aussi tardives du choc septique et en ayant recours à des modèles ex vivo. Ceci nous permettra, à terme, de développer un essai préclinique et in fine de proposer une stratégie thérapeutique qui vise à prévenir la dys-communication entre les cellules cérébrales chez les êtres humains lors d'un choc septique.

Les expérimentations seront réalisées chez la souris pour toutes les parties in vivo obligatoires. Nous utiliserons 2160 souris pour l'ensemble de notre travail. Pour chaque expérimentation, nous mettrons

en œuvre : (1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, (2) des procédures d'anesthésie/analgésie pour toutes les manipulations qui le nécessitent et (3) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux.

Par ailleurs dans le souci de réduire le nombre d'animaux, les premières étapes de sélection de molécules seront réalisées en culture.

8077 L'infection par le Virus T Lymphotrope Humain de type 1 (HTLV-1) est à l'origine du développement de pathologies humaines mortelles dont notamment la leucémie/lymphome T de l'adulte. Dans les zones de forte endémie (Afrique, Amérique du Sud et Centrale), l'allaitement maternel (supérieur à 6 mois) est le mode de transmission associée au développement, plusieurs décennies plus tard, de cette pathologie pour laquelle il n'existe aucun traitement.

Notre projet de recherche fondamentale vise à déterminer les mécanismes, encore inconnus, de ce mode de transmission, notamment comment le virus traverse la barrière digestive du nourrisson.

Le tube digestif du nourrisson présente des différences anatomiques et physiologiques avec celui de l'adulte, qui s'atténuent au fil du temps. En particulier, certaines cellules immunitaires dont les cellules dendritiques seraient moins nombreuses chez le nourrisson. Ces cellules étant des cibles reconnues de nombreux virus dont HTLV-1 pour disséminer l'infection dans l'organisme, nous désirons déterminer leur rôle dans la transmission du virus HTLV-1 à travers la barrière intestinale.

Peu de modèles animaux sont disponibles pour reproduire l'intégrité des facteurs impliqués dans la transmission du virus et la pathologie, hormis le modèle Primate Non Humain que le présent projet vise à remplacer. Les modèles de barrière intestinale in vitro rendent difficilement compte de la transmission à travers la muqueuse intestinale car tous les types cellulaires n'y sont pas présents, et ces modèles ne permettent pas d'étudier l'influence de l'âge.

En revanche, concernant la transmission au cours de l'allaitement, les modèles murins ont été utilisés pour différents rétrovirus (Mouse Mammary Tumor Virus chez la Souris, HTLV-1 chez le Rat). Les Rongeurs sont sensibles à l'infection par voie orale de HTLV, bien que ne développant ni production d'anticorps antiviraux détectables ni pathologie apparente, mais reproduisant un modèle d'infection chronique.

Nous souhaitons donc développer un modèle murin pour étudier l'efficacité du franchissement de la barrière intestinale par le virus HTLV. Un tel modèle permettrait des avancées majeures dans la compréhension physiologique des premières étapes de l'infection via l'allaitement.

Nous étudierons l'influence de l'âge des souris sur l'efficacité de ce franchissement viral. Enfin, nous déterminerons le rôle des cellules dendritiques dans le passage du virus à travers la barrière intestinale. Pour cela, des souris de différents âges seront infectées par voie orale par le virus HTLV-1, traitées ou non par injection sous-cutanée de FLT-3L (substance modulant le développement des cellules dendritiques). Du fait de l'absence de pathologie associée, après différents temps d'infection, soit les animaux seront mis à mort pour prélever leurs organes, soit des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours (jusqu'à 2 mois), pour évaluer la présence de virus (anticorps antiviraux ou génomes viraux) dans le sang. En termes de raffinement, les données expérimentales précédentes indiquent que l'infection par HTLV-1 de la souris n'est accompagnée d'aucune pathologie ou souffrance associée.

Ce projet, prévu pour une durée de 5 ans, comprend 3 procédures avec un degré de sévérité légère. Des prévisions statistiques permettent de réduire le nombre d'animaux utilisés à 408.

8078 Les différents types de cancers représentent l'une des principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde. Selon l'OMS, en 2012, environ 14 millions de nouveaux cas de cancers étaient recensés et en 2015, le cancer représentait 8,8 millions de décès dans le monde. Les traitements principaux actuels sont la chirurgie, la chimiothérapie et la radiothérapie. Ils visent la destruction des cellules proliférantes soit par résection de la tumeur soit par induction de la mort cellulaire. Malgré les progrès de ces techniques, celles-ci restent le plus souvent inefficaces face aux cancers métastasés. Les approches immunothérapeutiques ont connu de grandes avancées dans la lutte contre le cancer

ces dernières années, ayant donné lieu à l'approbation de plusieurs produits de ce type comme traitement de certains cancers.

Le but de ce projet est de tester le potentiel immunogénique d'un nouveau candidat d'immunothérapie anticancéreuse dans un modèle de souris humanisées pour le complexe majeur d'histocompatibilité de type I.

Bien que le modèle murin ne reproduise pas complètement la réponse immunitaire cellulaire et humorale observée chez l'homme, il reste néanmoins une bonne alternative. Il permet en effet d'évaluer la capacité de nouveaux candidats d'immunothérapie à induire des réponses immunitaires spécifiques sur lesquelles reposent le principe du mécanisme d'action du candidat et qui doivent conduire à l'élimination des cellules cancéreuses. Aucun modèle *in vitro* ne peut à l'heure actuelle s'y substituer. Le nombre de souris utilisées dans cette étude sera le plus faible possible sans pour autant compromettre les objectifs du projet. Ainsi, le nombre d'animaux a été défini afin de pouvoir réaliser des études statistiques fiables et d'exploiter au maximum les résultats obtenus lors de ces expériences.

Les conditions d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées seront appliquées pour respecter le bien-être de l'animal et limiter au maximum la souffrance subie par l'animal. De plus, les injections intraveineuses au niveau du sinus rétro-orbital seront réalisées sous anesthésie générale induite par inhalation d'isoflurane ou par injection intrapéritonéale d'un mélange de Kétamine/Xylazine à un ratio 2/1, préparation selon les recommandations de l'EU.

Ce projet inclura au total et au maximum 216 souris.

8079 La mycolactone est une molécule lipidique diffusible sécrétée par le pathogène humain *Mycobacterium ulcerans*, l'agent causal d'une maladie tropicale négligée appelée Ulcère de Buruli. Nos données acquises dans des modèles cellulaires indiquent que la mycolactone induit des perturbations dans la dynamique du cytosquelette d'actine, les réponses immunitaires et le métabolisme énergétique. Ce projet vise à caractériser la production bactérienne, la diffusion et la répartition tissulaire de la mycolactone dans l'organisme, ainsi qu'à déterminer si les effets observés *in vitro* opèrent *in vivo*. Il est donc indispensable de le réaliser dans un organisme entier. Les résultats générés par ce projet permettront de mieux comprendre la pathogénèse de l'Ulcère de Buruli, et le cas échéant d'identifier de nouveaux moyens de suivi de la maladie, ainsi que des approches thérapeutiques complémentaires au traitement antibiotique. La souris est sensible à l'infection par *M. ulcerans* et développe des lésions comparables à celles de l'homme, c'est le modèle animal choisi par la communauté scientifique pour l'étude de l'Ulcère de Buruli. Pour la réalisation de ce projet, nous avons tenté de réduire le nombre d'animaux autant que possible. Le nombre obtenu de 477 souris femelles tient compte du minimum de cellules à collecter pour l'analyse et inclut pour chaque série d'expérience le nombre nécessaire de contrôles. Il tient également compte de la nécessité de reproduire les résultats, afin de pouvoir identifier et exclure des artéfacts expérimentaux et ainsi des erreurs d'interprétation. Le degré de sévérité des procédures expérimentales envisagées est léger. En effet, une particularité de l'Ulcère de Buruli est son caractère indolore. La seule souffrance infligée aux animaux sera donc celle associée aux injections et prélèvements de sang.

8080 La sumoylation est une modification des protéines qui permet de moduler leurs fonctions dans la cellule. Ainsi, la sumoylation touche de nombreux aspects de la vie d'une cellule et des travaux récents ont montré son importance dans des pathologies à forte prévalence tel que le cancer.

Ce projet a pour objectif de tester *in vivo* l'importance de la sumoylation dans la plasticité cellulaire.

L'exemple le plus frappant de plasticité cellulaire est la reprogrammation de cellules différenciées en cellules souches pluripotentes (CSPi) grâce à un cocktail de 4 gènes. Nos données préliminaires sur des cultures de cellules montrent que ce processus, habituellement très peu efficace, est grandement amélioré lorsque les cellules sont hyposumoylées.

Nous avons pu disséquer par des études *in vitro* sur cultures cellulaires les mécanismes moléculaires par lesquels la sumoylation agit sur la plasticité cellulaire. Nous devons maintenant l'étudier au niveau de l'organisme entier, ce qui impose le recours à des animaux.

Ce projet nécessitera donc l'utilisation de 204 souris sur 5 ans réparties en 2 procédures :

Une procédure modérée impliquant 144 souris et une légère impliquant 60 souris.

Ce nombre représente le maximum d'animaux utilisés pour obtenir des résultats significatifs et pourra être réduit au vu des premiers résultats obtenus.

Les protocoles qui seront utilisés dans ce projet sont établis et publiés.

Ces procédures peuvent engendrer des souffrances pour les animaux, qui seront donc surveillés et mis à mort dès qu'ils présentent des signes avérés de souffrance selon la grille de suivi de la douleur recommandée par le comité d'éthique.

Le bénéfice attendu du projet est d'évaluer le rôle de la sumoylation dans la reprogrammation cellulaire ce qui augure des implications importantes dans la médecine régénérative et la compréhension du cancer.

8081 La tumorigenèse est une condition pathologique où le fer est absolument requis pour les cellules cancéreuses afin de nourrir leur activité métabolique. Un certain nombre de laboratoires ont mis en évidence que l'hepcidine, l'hormone clé du métabolisme du fer, est surexprimée par les cellules cancéreuses dans différents types de tumeurs, notamment le cancer du côlon.

1. Le premier axe de notre projet vise à déterminer l'implication de l'hepcidine dans l'initiation et la progression tumorale des cancers du côlon. Nous avons montré *in vitro* que l'hepcidine synthétique humaine induit la prolifération de lignées cancéreuses coliques. D'autre part, nous avons eu accès, dans le cadre d'une collaboration, à des échantillons de colon d'un modèle génétique de souris développant un cancer du côlon et pu montrer que l'hepcidine y était surexprimée. Nous faisons l'hypothèse que l'expression de l'hepcidine dans les cellules coloniques cancéreuses favorise l'accumulation du fer cellulaire et la prolifération cellulaire. L'approche *in vivo* chez l'animal est toutefois nécessaire pour étudier si l'expression de l'hepcidine endogène induit bien la tumorigenèse dans ce type de cancer. La souris est l'animal d'expérience par excellence en raison de la disponibilité d'outils biologiques et de souches de souris génétiquement modifiées. Nous comparerons le développement tumoral colique induit par un traitement chimique, chez des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas l'hepcidine et chez des souris sauvages. Le développement tumoral sera suivi par échographie.

2. Il a été récemment mis en évidence un rôle immunomodulateur de l'hepcidine, permettant de recruter et activer des cellules immunitaires. Notre hypothèse de travail pour ce second axe est la suivante : l'hepcidine, de par ses propriétés d'immunomodulation, devrait permettre de stimuler l'immunité innée et les coopérations entre les populations immunitaires au site tumoral afin de rétablir une immunité anticancéreuse efficace. De plus, nous avons montré, dans des expériences préalables *in vitro* que 1) l'hepcidine ne module pas les niveaux de fer des cellules de mélanome et 2) l'addition d'hepcidine diminue l'invasivité des cellules de mélanomes. L'hepcidine, dans le cas du mélanome, pourrait avoir un effet anti-tumoral. Nous étudierons donc les effets de l'injection d'hepcidine chez des souris sauvages ayant reçu des cellules de mélanome. Le suivi du développement tumoral ainsi que le développement d'éventuelles tumeurs métastatiques après exérèse chirurgicale de la tumeur, seront effectués grâce à des techniques d'imagerie non invasives.

Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute douleur à l'animal. Les prélèvements d'organes pour études biologiques ultérieures sont tous faits en post mortem. Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 148. Pour respecter le principe des 3R, un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. Des paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation, ont déjà été déterminés dans d'autres projets et permettent de réduire encore le nombre d'animaux. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques seront prévus en cas de nécessité. Enfin, des points limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ces études du rôle de l'hepcidine *in vivo* chez la souris sont essentielles afin d'appréhender la dualité du rôle de l'hepcidine et déterminer quelle est la bonne stratégie thérapeutique à envisager. Ces

études permettront à terme de définir l'hepcidine comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le cancer.

8082 La tumorigenèse est une condition pathologique où le fer est absolument requis pour les cellules cancéreuses afin de nourrir leur activité métabolique. Un certain nombre de laboratoires ont mis en évidence que l'hepcidine, l'hormone clé du métabolisme du fer, est surexprimée par les cellules cancéreuses dans différents types de tumeurs, notamment le cancer du côlon.

1. Le premier axe de notre projet vise à déterminer l'implication de l'hepcidine dans l'initiation et la progression tumorale des cancers du côlon. Nous avons montré *in vitro* que l'hepcidine synthétique humaine induit la prolifération de lignées cancéreuses coliques. D'autre part, nous avons eu accès, dans le cadre d'une collaboration, à des échantillons de colon d'un modèle génétique de souris développant un cancer du côlon et pu montrer que l'hepcidine y était surexprimée. Nous faisons l'hypothèse que l'expression de l'hepcidine dans les cellules coloniques cancéreuses favorise l'accumulation du fer cellulaire et la prolifération cellulaire. L'approche *in vivo* chez l'animal est toutefois nécessaire pour étudier si l'expression de l'hepcidine endogène induit bien la tumorigenèse dans ce type de cancer. La souris est l'animal d'expérience par excellence en raison de la disponibilité d'outils biologiques et de souches de souris génétiquement modifiées. Nous comparerons le développement tumoral colique induit par un traitement chimique, chez des souris génétiquement modifiées n'exprimant pas l'hepcidine et chez des souris sauvages. Le développement tumoral sera suivi par échographie.

2. Il a été récemment mis en évidence un rôle immunomodulateur de l'hepcidine, permettant de recruter et activer des cellules immunitaires. Notre hypothèse de travail pour ce second axe est la suivante : l'hepcidine, de par ses propriétés d'immunomodulation, devrait permettre de stimuler l'immunité innée et les coopérations entre les populations immunitaires au site tumoral afin de rétablir une immunité anticancéreuse efficace. De plus, nous avons montré, dans des expériences préalables *in vitro* que 1) l'hepcidine ne module pas les niveaux de fer des cellules de mélanome et 2) l'addition d'hepcidine diminue l'invasivité des cellules de mélanomes. L'hepcidine, dans le cas du mélanome, pourrait avoir un effet anti-tumoral. Nous étudierons donc les effets de l'injection d'hepcidine chez des souris sauvages ayant reçu des cellules de mélanome. Le suivi du développement tumoral ainsi que le développement d'éventuelles tumeurs métastatiques après exérèse chirurgicale de la tumeur, seront effectués grâce à des techniques d'imagerie non invasives.

Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale pour éviter toute douleur à l'animal. Les prélèvements d'organes pour études biologiques ultérieures sont tous faits en post mortem. Le nombre total de souris utilisé sur 5 ans sera de 148. Pour respecter le principe des 3R, un nombre minimum d'animaux sera inclus dans chaque groupe pour assurer la reproductibilité de l'expérience et appliquer des tests statistiques entre les différentes conditions. Des paramètres expérimentaux, tels que le type cellulaire et le nombre de cellules nécessaires à l'implantation, ont déjà été déterminés dans d'autres projets et permettent de réduire encore le nombre d'animaux. De plus, afin de limiter au maximum la souffrance et l'angoisse infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques seront prévus en cas de nécessité. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Ces études du rôle de l'hepcidine *in vivo* chez la souris sont essentielles afin d'appréhender la dualité du rôle de l'hepcidine et déterminer quelle est la bonne stratégie thérapeutique à envisager. Ces études permettront à terme de définir l'hepcidine comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans le cancer.

8083 La paroi bactérienne, qui regroupe un grand nombre de molécules uniques aux bactéries, est un composé essentiel à leur survie. Ces composants représentent des marqueurs uniques reconnus par d'autres organismes notamment les mammifères pour détecter leur présence dans leur environnement. Ainsi, bactéries et hôte communiquent pour établir un équilibre.

Néanmoins, certaines bactéries ont développé des mécanismes de virulence qui manipulent leur détection par l'hôte. Certains de ces mécanismes de virulence impliquent des modifications de la paroi bactérienne qui rendent les bactéries pathogènes invisibles à l'hôte ou bien insensibles aux réponses antimicrobiennes mise en place par l'hôte. Nous étudions ces nouveaux mécanismes dans deux

modèles de bactéries pathogènes du système digestif; *H. pylori*, responsable de pathologies gastriques pouvant être sévères comme le cancer d'estomac, et *Escherichia coli*, responsable de gastroentérites et souvent associé à des maladies chroniques inflammatoires de l'intestin.

L'objectif de ce projet de recherche fondamental est d'étudier ces mécanismes de modification de la paroi bactérienne qui permettent l'échappement aux réponses de défense de l'hôte. Nous utiliserons ici des souris déficientes ou non pour certains récepteurs de l'immunité afin d'observer la virulence des pathogènes à l'égard de l'hôte et la réponse de ce dernier.

Les bénéfices attendus grâce à ces nouvelles connaissances sont de pouvoir développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant ces fonctions importantes pour la survie de ces deux pathogènes dans leur niche.

Bien que les études préliminaires en laboratoire fournissent beaucoup d'informations, le pouvoir pathogène/la réponse immunitaire ne peut être étudiée autrement que dans le contexte de l'infection d'organismes vivants, ici l'animal.

Nous utiliserons ici environ 4600 souris sur une période de 5 ans. La majorité des souris (3525) sera utilisée dans une procédure de degré léger de sévérité et le reste dans une procédure de classe modérée. Ce calcul du nombre de souris est basé sur l'expérience de la conception de ce type de projet, pour limiter au maximum le nombre de souris, tout en assurant la validité statistique des résultats. Le choix de ce modèle animal repose sur la grande proximité en termes de physiologie et de système immunitaire entre l'homme et la souris. Les infections provoquées pour les besoins du projet ne sont pas fatales à l'animal et n'occasionnent que peu d'effets néfastes. De plus la période d'observation est réduite dans le temps (généralement inférieure ou égale à 3 mois). Néanmoins si nous devons observer un quelconque effet provoquant un inconfort altérant le bien-être de l'animal au cours de l'étude, celui-ci serait mis à mort.

8084 Après 40 ans, un homme sur trois a des troubles de l'érection, pouvant avoir une incidence sur la qualité de vie des patients. La dysfonction érectile (DE) est un symptôme sentinelle des maladies cardio-vasculaires mais peut être également due à des traumatismes (chirurgicaux ou accident). Les traitements actuels présentent soit des contre-indications importantes soit des contraintes d'utilisation et/ou de prescription, d'où l'importance de développer de nouveaux candidats médicaments sur différents types de modèles.

L'érection est une fonction complexe faisant intervenir des mécanismes vasculaires, musculaires et nerveux. Avec ce projet, nous allons mettre en place un modèle d'érection induite électriquement pour évaluer la dysfonction érectile et l'effet de candidats médicaments sur celle-ci. L'évaluation va se faire par la mesure de la pression intra-caverneuse chez le rat mâle anesthésié simultanément à la mesure de la pression artérielle, paramètre important pour l'évaluation des candidats médicament dans ce domaine.

Actuellement, les méthodes alternatives in vitro et ex vivo permettant de travailler sur les nombreux aspects du contrôle neuro-hormonal nécessitent une étude chez l'animal. C'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale reste nécessaire pour comprendre et traiter la dysfonction érectile.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce projet sera de 900 rats en raison 15 rats par groupe (minimum nécessaire pour l'obtention de 10 animaux inclus), sur une période de 4 à 8 semaines post traitement. Le nombre de groupes étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester.

Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE, à savoir 2 ou 3 animaux par cage, et un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Durant toute la période d'expérimentation, un contrôle quotidien sera réalisé afin de s'assurer de l'état général des animaux et de détecter des comportements atypiques suite aux éventuels effets secondaires des traitements :

- altération des fonctions normales,
- tremblements, anomalies,
- perte de poids > 20% du poids initial,
- posture anormale.

Notre stratégie permet donc de réduire 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). Dans le cas de prétraitements, un nombre minimum d'animaux sera utilisé pour réaliser l'étude en respectant la règle des 3 R.

8085 Le cancer de l'ovaire est le septième cancer le plus fréquemment observé chez les femmes dans le monde, comme dans l'Union européenne. De plus, 90% des cancers de l'ovaire chez l'adulte sont des cancers épithéliaux diagnostiqués à un stade avancé dans 70 à 80% des cas (stade III ou IV selon la classification FIGO), soit après dissémination péritonéale des foyers tumoraux. On parle alors de carcinoses péritonéales retrouvées chez 85% des patientes atteintes d'un cancer épithélial ovarien. Le traitement consiste en une chirurgie cytoréductrice la plus complète possible, et de la chimiothérapie. Celui-ci apporte rarement une guérison, mais il peut retarder la progression du cancer, diminuer les symptômes, prolonger et améliorer la qualité de vie des patientes.

Principalement 2 approches sont utilisées pour mimer les événements biologiques associés aux processus de cancer : une approche in vitro, basée sur l'utilisation de lignées cellulaires ou de cellules cancéreuses isolées à partir de biopsie et des approches in vivo, basées sur l'utilisation d'animaux de laboratoire, chez lesquels des tumeurs sont transplantées. Les modèles in vitro ne recréent ni la diversité de l'environnement tumoral, ni la difficulté pour une molécule testée d'atteindre les cellules cibles. De plus, il est impossible d'étudier la dissémination péritonéale et le développement métastatique dans ces modèles. Ces limitations rendent donc incontournables le recours à l'expérimentation animale pour tester l'efficacité de nouvelles thérapies.

Parmi les approches in vivo, on distingue l'utilisation de lignées cellulaires cancéreuses injectées à des souris et l'implantation de tumeurs issues de patientes (PDX). Les modèles de lignées cellulaires cancéreuses combinent les avantages de travailler avec des lignées cellulaires tumorales humaines (sources quasi-inépuisables et variées), en condition orthotopique (site d'injection correspondant à celui de la tumeur d'origine et présence du microenvironnement tumoral) et en injection intrapéritonéale pour l'étude dans notre cas de la carcinose péritonéale. Les modèles PDX, contrairement aux modèles de lignées cellulaires, reproduisent l'hétérogénéité des tumeurs de patientes. Les modèles PDX permettent l'obtention d'une excellente corrélation entre les réponses obtenues dans ces modèles et les réponses en clinique chez la patiente en question. Ils représentent donc un outil précieux pour l'évaluation préclinique de nouveaux agents thérapeutiques. Leur limite est le temps nécessaire pour la prise tumorale ainsi que la réimplantation sous-cutanée qui ne permet pas de développement métastatique. Il est donc nécessaire de développer un ensemble de modèles pour pouvoir s'adapter au mieux de la stratégie thérapeutique envisagée (pharmacocinétique, mécanisme d'action.).

L'objectif de cette étude est de mettre en place des modèles de cancer de l'ovaire chez la souris pour permettre l'évaluation de nouvelles molécules anticancéreuses. Quatre types de modèles seront développés chez des souris immunodéficientes :

- Modèle orthotopique de lignées cellulaires cancéreuses ovariennes (étude de la croissance primaire et/ou dissémination locale).
- Modèle intrapéritonéal de lignées cellulaires cancéreuses ovariennes (carcinose péritonéale).
- Modèle PDX sous-cutanée de tumeurs ovariennes provenant de patientes (étude de la croissance primaire).
- Modèle PDX intrapéritonéal de tumeurs ovariennes (après dissociation) provenant de patientes (carcinose péritonéale).

Dans ces modèles, la croissance tumorale sera suivie au cours du temps par des techniques non-invasives : soit par mesure au pied à coulisse pour les tumeurs implantées en sous-cutanées soit par imagerie de bioluminescence ou fluorescence in vivo pour la mesure de la croissance primaire et du développement métastatique. L'utilisation de ces techniques non-invasives permet d'observer au cours du temps un seul animal simplement anesthésié, là où l'information devait être obtenue par euthanasie et autopsie de multiples individus à chaque stade d'une seule étude permettant ainsi de réduire sensiblement le nombre d'animaux. Dès leur arrivée dans la zone d'exploration fonctionnelle, les animaux seront hébergés dans des conditions définies par la directive européenne 2010/63/UE et

un enrichissement sera introduit dans l'hébergement des animaux. Ainsi, ce projet sera réalisé selon les exigences de la règle des 3-R (remplacement, réduction et raffinement).

Le nombre de souris nécessaire à cette étude est de 1 500 comprenant la mise au point des 4 modèles et l'évaluation de candidats médicament (en raison de 10 animaux par groupe ce qui est le minimum nécessaire pour l'obtention de résultats statistiquement significatifs, le nombre de groupe étant fonction du nombre de molécules et/ou doses à tester mais classiquement un protocole expérimental type comprendra 5 groupes expérimentaux).

8086 Les infections de la peau (superficielles ou lors de blessures) sont responsables d'un très grand nombre de complications tous les ans pouvant aller jusqu'au décès de la personne. Il est pour cela nécessaire d'avoir à disposition de la recherche pharmaceutique des méthodes d'évaluation de nouveaux composés permettant le traitement de ces pathologies. Nous avons pour ambition d'optimiser des modèles existants permettant une évaluation plus rapide et plus prédictive des effets chez l'homme. Dans l'approche des traitements des maladies infectieuses, le développement de modèles de pharmacologie chez l'animal demeure indispensable. Les tests *in vitro* à disposition, effectués préalablement pour valider l'intérêt de la cible, ne permettent pas d'appréhender les mécanismes d'action de l'infection et les interactions hôtes/pathogènes dans leur ensemble. Nous avons mis en place une plateforme technique qui propose un ensemble de prestations en pharmacologie sur l'animal pour l'étude des maladies infectieuses ou inflammatoires. Les modèles utilisés et développés pour le projet sont des modèles souris. Une attention toute particulière est portée sur le nombre d'animaux utilisés dans le projet. Nous travaillons avec une société spécialisée dans les biostatistiques. Cette collaboration nous permet d'utiliser le nombre strictement nécessaire pour chaque expérience et de l'optimiser durant toute la durée du projet.

Le nombre calculé de souris utilisées est de maximum : 450/an (2250 sur 5 ans). Une veille scientifique est mise en œuvre pour étudier toute méthode scientifique alternative à l'expérimentation animale dans le domaine. Pour les protocoles où la douleur ne peut pas être prise en charge par des analgésiques, une observation accrue et des critères d'arrêt plus stricts seront mis en place (surveillance journalière, suivi du poids des animaux).

8087 Nous nous intéressons à la dystrophie musculaire oculopharyngée (OPMD) qui est une maladie génétique due à une mutation dans le gène PABPN1. Alors que cette protéine est ubiquitaire, seuls quelques muscles très particuliers sont atteints chez les patients OPMD sans que l'on sache encore aujourd'hui pourquoi. Le principal marqueur histologique de la maladie est la présence d'agrégats intranucléaires (ou inclusions) dans les muscles des patients OPMD. Ces agrégats insolubles séquestrent différentes protéines dont PABPN1 et également des ARN. Plusieurs études ont montré que la diminution du nombre d'agrégats améliore le phénotype musculaire dans des modèles OPMD. Nous disposons d'un modèle de souris transgénique OPMD qui surexprime PABPN1 muté qui récapitule un grand nombre de signes pathologiques retrouvés chez les patients OPMD : la présence d'agrégats nucléaires, une atrophie et faiblesse musculaire, une fibrose.

Dans ce contexte, ce projet consiste à tester dans ce modèle de souris différentes molécules capables de désagréger les inclusions nucléaires et d'améliorer le phénotype musculaire. Ces molécules pharmacologiques (qui sont pour la plupart du repositionnement de molécules dont l'absence de toxicité a déjà validée chez l'homme) ont été au préalable testées dans un modèle cellulaire et dans un modèle drosophile OPMD pour démontrer leur efficacité *in vitro*. L'étude consiste maintenant à tester ces molécules *in vivo* par gavage dans le modèle souris OPMD. Le protocole consiste à traiter des souris avec différentes molécules pendant 13 semaines pour ensuite évaluer la force musculaire, l'état histologique du muscle et la quantité d'agrégats nucléaires.

Au total, 132 souris (OPMD et contrôle) seront utilisées. En respect de la règle des 3R, pour le remplacement, nous utiliserons des molécules ayant déjà montré un effet positif sur la diminution des agrégats nucléaires en culture primaire ou validées dans un modèle drosophile OPMD. Pour la réduction, nous utilisons le nombre minimum de souris nécessaire pour avoir des différences statistiquement significatives entre les groupes de souris. Outre les contrôles journaliers (prise d'eau et de nourriture, état globale de la souris) par le personnel affecté au soin des animaux, l'état de santé

des souris sera évalué chaque semaine et les animaux qui montrent un signe quelconque de détérioration de santé seront euthanasiés.

8088 L'insuffisance ovarienne prématurée (IOP) touche 1 femme sur 100 avant l'âge de 40 ans. Cette pathologie est notamment caractérisée par une aménorrhée (arrêt des menstruations) primaire ou secondaire. Il s'agit d'un dysfonctionnement ovarien qui aura pour impact, non seulement d'induire une stérilité précoce chez les patientes atteintes, mais aussi d'induire de nombreuses complications sur leur santé générale avec des risques accrus d'ostéoporose et de maladies cardiovasculaires, du fait de l'absence de production d'hormones sexuelles féminines.

Le gène FOXL2 qui joue un rôle crucial dans la détermination et la différenciation ovarienne, est incriminé dans certaines IOP. Dans l'espèce humaine, différents types de mutation peuvent perturber l'expression de FOXL2. Hormis les mutations situées dans le gène lui-même, des délétions de régions génomiques localisées en amont du gène FOXL2 perturbent son expression. La plus petite région délétée appelée SRO (Smallest Region of Overlap) présente une taille de 7000 pb. L'absence de cette région perturbant l'expression de FOXL2, il apparaît qu'elle contient un ou plusieurs éléments régulateurs cruciaux pour FOXL2. Afin de déterminer quels sont ces éléments régulateurs et leur rôle précis, des délétions de ces éléments vont être réalisées chez la souris. Dans ce cadre, il est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. En effet, FOXL2 en plus de l'ovaire est exprimé dans d'autres tissus (utérus, muscle des paupières, hypophyse) et les éléments régulateurs pourraient être différents en fonction des tissus considérés. Ainsi, les mécanismes étudiés impliquent des interactions génomiques complexes a priori spécifiques d'un organe, rendant impossible le remplacement de l'animal par des lignées cellulaires établies.

La présente demande d'autorisation concerne une demande d'élever des lignées de souris à phénotype potentiellement dommageable. En effet, d'après les données de la littérature, il apparaît qu'en absence d'expression du gène FOXL2, l'un des effets est notamment une pousse anormale des incisives après le sevrage des animaux. Si ce phénotype est observé, les incisives seront coupées aux ciseaux chaque semaine afin de permettre aux animaux mutants de s'alimenter correctement. De plus leur poids sera mesuré deux fois par semaine afin de s'assurer que leur prise de poids est normale. L'absence de prise de poids au-delà d'une semaine, constitue un critère d'arrêt de l'expérimentation et l'animal sera euthanasié.

De façon générale, des échelles cliniques journalières et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux. Les souris bénéficieront dans chaque cage d'un enrichissement de leur milieu (sopalin, rouleaux de cartons). Les animaux seront en groupe pour éviter l'isolement.

Ce projet implique un élevage important afin d'obtenir des animaux femelles homozygotes mutants dits « SRO -/- ». Au maximum, sept lignées différentes seront étudiées : SRO-/- (toute la région génomique SRO), SRO.1-/-, SRO.2-/-, SRO.3-/-, SRO.4-/-, SRO.5-/-, SRO.6-/- (sous-parties de la région SRO). Les animaux hétérozygotes SRO+/- qui sont croisés entre eux proviennent d'élevages reconnus et sont nés en captivité. Le projet débutera par l'analyse des souris SRO-/-, puis en fonction du phénotype observé, le projet pourra être étendu aux autres lignées.

Quatre animaux hétérozygotes (deux mâles et deux femelles), seront utilisés pour amplifier la lignée et obtenir des souris homozygotes mutantes pour la région SRO. Afin de pouvoir mener à bien les différentes observations prévues un maximum de 30 femelles mutantes -/- par lignée sont nécessaires.

Néanmoins, afin d'obtenir ces animaux de génotype d'intérêt, plusieurs croisements seront nécessaires et de nombreux descendants seront générés. Au total pour chaque lignée un maximum de 300 animaux sera généré (dont seulement ¼ seront homozygotes mutants).

Afin de limiter l'utilisation des animaux, les différentes lignées prévues seront analysées les unes après les autres. En fonction des résultats obtenus dans les lignées précédentes, le projet pourrait donc ne pas nécessiter l'analyse des 7 lignées de souris initialement prévues. Néanmoins, si tel était le cas, un maximum de 2100 animaux serait généré (300*7 lignées ; dont seulement ¼ seraient à phénotype potentiellement dommageable).

Lors de la conception du protocole expérimental, nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant à l'obtention de résultats statistiquement exploitables.

De façon générale, les critères d'arrêt en cours d'élevage sont (i) des signes de mal-être (prostration, état du pelage, amaigrissement), (ii) l'arrêt de l'état reproductif. En cas de signe de mal-être ou d'arrêt de l'état reproductif, l'animal est immédiatement euthanasié. En cas d'évènement indépendant du protocole (blessure, maladie, défaillance technique, statut sanitaire...), après discussion avec le personnel de l'animalerie et le vétérinaire, la solution que nous adopterions dépendrait principalement de deux critères : le degré de souffrance de l'animal et la possibilité d'utiliser l'animal une fois guéri. Dans tous les cas de maladies, un animal malade ou un prélèvement d'un animal malade sera envoyé au contrôle sanitaire pour vérifier la nature de la maladie, et la possibilité de traitement. Si l'infection est connue, bénigne, et que le traitement est court et sans incidence connue sur la reproduction, le traitement sera privilégié, en concertation avec les personnels compétents de l'animalerie. En revanche, si la souffrance de l'animal est trop grande ou si l'animal une fois guéri ne peut plus être inclus dans nos protocoles (trop âgé, maladie ou traitement nocif pour la reproduction), il sera euthanasié sans traitement.

8089 Les cellules sensorielles auditives sont surmontées d'une touffe ciliaire où se produit la transduction mécano-électrique auditive. La touffe ciliaire est la structure réceptrice des ondes sonores. Elle est constituée de microvillosités, appelées stéréocils, qui sont constitués de filaments d'actine. Le complexe de transduction se situe dans la région apicale des stéréocils. Celui-ci permet de convertir les ondes acoustiques en signal électrique qui se propage ensuite jusqu'au cerveau. Une atteinte de cette structure entraîne une surdité irrémédiablement. Au cours du développement, les stéréocils émergent sous forme de microvillosités de même taille qui vont ensuite s'allonger de manière différentielle pour finalement former trois rangées de taille croissante. La mise en place et le maintien de la longueur des stéréocils par l'assemblage/désassemblage des filaments d'actine sont essentiels pour l'audition.

Le projet vise :

A. à identifier et comprendre la fonction des molécules qui concourent à l'assemblage/désassemblage respectif au sommet et à la base des filaments d'actine pour chaque rangée de la touffe ciliaire.

B. à valider l'hypothèse de l'existence de gradients de concentration de ces molécules entre les différentes rangées. Ces gradients pourraient expliquer la longueur différentielle des rangées de stéréocils.

Sur la période de 5 ans, nous aurons recours à un total estimé de 3810 souris. Ces animaux porteurs de différentes anomalies génétiques seront mis à mort avec humanité pour récupérer les oreilles internes. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, ceux-ci seront systématiquement génotypés, les mâles et les femelles seront utilisés sans distinction, et les deux oreilles de chaque animal seront systématiquement utilisées pour les différentes expérimentations, des anticorps différents (issus d'espèces différentes) seront testés sur le même échantillon, ce qui permet de réduire le nombre d'échantillons à utiliser.

Les deux procédures expérimentales n'auront qu'un impact léger sur le bien-être des animaux. Pour les tests auditifs (première procédure), les animaux seront anesthésiés avec une injection intrapéritonéale d'un mélange de xylazine et kétamine. La deuxième procédure ne consistera qu'en un prélèvement de l'oreille interne sur souris mises à mort, provenant de plusieurs lignées mutantes, après génotypage.

Pour chaque lignée de souris, un nombre important d'expérimentations devra être mené dont des expériences d'immunohistochimie, des études de la morphologie tridimensionnelle des stéréocils et des tests de physiologie auditive.

Aujourd'hui, Il n'existe aucune alternative à l'expérimentation animale pour ce projet car aucun des systèmes auditifs périphériques ou centraux ne peut encore être reconstruit in vitro. De plus, il n'a pas encore été possible de proposer des modèles computationnels du fonctionnement du système auditif dans son ensemble.

Ce projet permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'origine des surdités chez l'homme, dont une bonne partie serait causée par des anomalies de la touffe ciliaire.

8090 L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies touchent environ 1 garçon sur 3500 pour la dystrophie de Duchenne (DMD) et 1 personne sur 50 000 pour les LGMD. Elles sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. La morbidité de ces pathologies est associée à des atteintes cardiaques ou respiratoires.

Dans ce projet, nous souhaiterons réaliser l'apprentissage d'une technique particulière appelée dénervation unilatérale du diaphragme ; avec pour objectif principal la maîtrise du geste technique qui sera validée par la perte de contraction du côté dénervé du diaphragme. Cette technique permet d'obtenir une condition où le muscle subit un étirement cyclique, ce qui induit une hypertrophie, condition qui permet d'aborder ce mécanisme mais très difficile à générer d'une autre façon. La dénervation ne peut pas être faite sur des cellules. Cette technique doit donc être faite sur la souris. Le critère de remplacement n'est pas applicable pour ces études. Une fois la technique acquise dans ce projet, nous pourrons l'appliquer dans d'autres projets pour étudier les conséquences moléculaires induites par cette procédure sur les différents modèles murins de dystrophies musculaires afin de les comparer à une situation non malade. L'objectif de ces futures études sera de comprendre le rôle de deux protéines impliquées dans des dystrophies musculaires et qui sont proposées pour jouer un rôle dans la réponse hypertrophique du muscle induit par un étirement. Cette technique nous permettra de valider cette dernière hypothèse, ouvrant alors la porte à la compréhension du mécanisme physiopathologique et donc à une meilleure prise en charge des patients et à des possibilités thérapeutiques.

Dans ce projet, nous utiliserons des animaux initialement prévus pour être réformés. Nous estimons que 81 souris seront utilisées. Ce nombre est estimé d'après notre expérience pour pouvoir assurer l'apprentissage initial qui sera réalisé en présence d'experts de cette technique ainsi que l'acquisition en autonomie de la maîtrise de la technique (acquisition de la technique par répétition de la technique toute les semaines pendant 3 mois). Dans cette procédure, nous appliquerons des méthodes permettant une anesthésie très profonde et une analgésie très contrôlée. Après le geste technique les souris seront rapidement euthanasiées.

8091 L'hypersensibilité à la douleur induite par les opioïdes est un phénomène bien admis maintenant par la plupart des cliniciens. Il s'agit donc d'un véritable problème de santé publique qui a été la cible de très nombreuses recherches ces dernières années. Des études précliniques ont effectivement montré que les analgésiques opiacés comme la morphine activent simultanément, dès la première administration, non seulement des systèmes inhibiteurs de la nociception mais également des systèmes facilitateurs de la nociception (systèmes pro nociceptifs). Le développement de la tolérance résulterait de l'activation progressive de systèmes d'opposition (systèmes facilitateurs de la nociception) par les opioïdes eux-mêmes. Cette activation tendrait ainsi à masquer les effets analgésiques et pourrait conduire à des hypersensibilités à la douleur de manière durable (hyperalgésie et allodynie). Notre projet s'intéresse à une cible innovante dans le domaine de la douleur, le récepteur FLT3. En effet, ce récepteur plus connu pour son implication dans la différenciation et le développement des cellules hématopoïétiques ainsi que dans l'apparition de leucémies pourrait aussi avoir un rôle dans l'hyperalgésie induite par les opioïdes. Pour étudier plus précisément celui-ci, des animaux (rats et souris) rendus déficients pour le gène qui code pour le récepteur FLT3 seront utilisés. Les effets des analgésiques tels que la morphine et la buprénorphine seront évalués via la mesure du seuil nociceptif des animaux en utilisant des tests classiques de nociception. A côté de cela, les effets du fentanyl, un puissant analgésique opioïde utilisé en chirurgie chez l'homme sera évalué dans un modèle de douleur post-opératoire. Afin de répondre à la règle des 3R, les effets pharmacologiques de molécules à visée analgésique doivent être évalués au travers de systèmes intégrés afin de prendre en considération les réponses physiologiques adaptatives que l'organisme met en place pour s'opposer à la perturbation homéostasique engendrée par l'administration de molécules exogènes. Ce sont par ces approches intégrées que de nombreuses

données ont mis en évidence le rôle paradoxal des opioïdes dans le traitement de la douleur. Il est donc indispensable de poursuivre les investigations chez l'animal afin de mieux appréhender les effets indésirables des molécules morphiniques afin de proposer des alternatives thérapeutiques pour une amélioration de la prise en charge de la douleur. Le nombre estimé de souris sera de 352 et de 450 pour les rats. Une habituation de minimum une semaine est réalisée au cours de laquelle les animaux sont placés dans la pièce expérimentale pendant minimum 1h puis exposés aux différents tests sans appliquer de stimulus nociceptif. Cela permet aux animaux de s'habituer à l'environnement ainsi qu'à l'expérimentateur ce qui limite l'impact du stress lié à la procédure expérimentale. Cette période d'habituation est fondamentale afin d'assurer une reproductibilité des tests nociceptifs, de limiter l'angoisse et stress des animaux assurant alors une meilleure homogénéité dans les différents lots expérimentaux. Ceci nous permet donc également de réduire le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, les animaux sont stabulés en cage collective (2 animaux/cage pour les rats ou 10 animaux/cage pour les souris) dans une animalerie dans laquelle la température et l'hygrométrie sont contrôlées. Les locaux sont en légères surpression, les cages possèdent des couvercles filtrants, les animaux bénéficient d'un enrichissement du milieu (copeaux, igloos en plastique, bâtonnets de cellulose).

8092 Dans le présent projet, nous testerons l'effet d'une combinaison thérapeutique vaccination/chimiothérapie anti-cancéreuse sur la réponse immunitaire afin d'évaluer les potentiels bénéfiques d'une telle combinaison chez l'homme. Nous utiliserons notre agent chimio thérapeutique en cours d'étude clinique chez l'homme et qui semble apporter un bénéfice en oncologie (études en cours). Cependant, ces études préliminaires sont nécessaires pour déterminer la stratégie des modèles animaux d'efficacité et pour justifier d'une demande d'autorisation d'essai clinique chez l'homme en thérapie combinée.

L'étude sera réalisée chez la souris. Compte tenu de la variabilité interindividuelle de la réponse immunitaire, 5 souris par groupe seront utilisées pour assurer la robustesse des résultats statistiques et éviter la répétition des expérimentations. Différentes concentrations de notre produit seront testées, et plusieurs séries d'études sont prévues dans ce projet pour déterminer les conditions optimales de thérapie combinée. Le présent projet prévoit d'utiliser un nombre de 100 souris. Après injection des produits, les souris seront hébergées et monitorées pendant 14 jours avant sacrifice et prélèvement des rates pour la réalisation des expérimentations.

Pour les études portant sur la réponse immunitaire, les essais sur animaux demeurent irremplaçables en raison de la complexité de cette réponse. Dans le présent projet, les substances injectées ne devraient pas avoir d'effet adverse sur les animaux, si tel n'était pas le cas, les souris seront euthanasiées si nécessaire avant la fin de l'expérimentation. Pendant toute la durée de l'étude, les animaux bénéficieront d'un hébergement en groupe sociaux et de différents objets destinés à enrichir leur environnement.

8093 Ce projet a comme but principal d'étudier les mécanismes neurobiologiques impliqués dans le risque persistant de rechute. L'addiction est un trouble mental caractérisé par la prise compulsive de drogue qui persiste malgré des conséquences négatives. L'un des problèmes majeurs dans le traitement de l'addiction est la prévention des rechutes qui peuvent être observées après une longue période d'abstinence. Quelques études suggèrent qu'une dérégulation du métabolisme du cholestérol jouerait un rôle dans l'addiction, et plus particulièrement que l'expression de protéines impliquées dans ce métabolisme serait modifiée aussi bien chez l'Homme, que dans des modèles animaux d'addiction, en réponse à la cocaïne ou à l'alcool. De plus, des résultats obtenus récemment dans notre laboratoire montrent qu'un traitement par des statines, pendant une période de sevrage réduit considérablement le comportement de recherche de drogues. Les statines agissent principalement en diminuant les taux de cholestérol car elles inhibent l'enzyme responsable de la synthèse du cholestérol. Notre hypothèse de travail est qu'une dérégulation du métabolisme du cholestérol serait impliquée dans le phénomène d'addiction et qu'en diminuant les taux de cholestérol cérébraux, il serait possible de reverser les « empreintes » laissées durablement par les drogues dans le cerveau et responsables de l'addiction.

Pour tester notre hypothèse, 1) nous allons caractériser par des études moléculaires et cellulaires, les modifications du métabolisme du cholestérol induites par des injections répétées de cocaïne ; 2)

nous utiliserons un modèle animal de l'addiction (auto-administration de cocaïne et d'alcool) et nous allons le coupler à une approche d'expression de gène via l'injection d'un virus non pathogène, pour exprimer la cholestérol-24-hydrolase (CYP46A1), enzyme responsable de la dégradation du cholestérol pour diminuer les taux de cholestérol cérébraux et mesurer l'impact de cette diminution sur le comportement de recherche de drogue après une période de sevrage.

Afin de caractériser l'implication du métabolisme du cholestérol dans l'addiction, nous déterminerons : 1) si des injections répétées de cocaïne module les taux de cholestérol et de ses différents métabolites dans les structures cérébrales; 2) si des injections répétées de cocaïne module l'expression de différents acteurs (enzyme de synthèse, transporteurs, enzyme de dégradation) du métabolisme du cholestérol dans les structures cérébrales; 3) si chez des rats abstinents après une phase d'auto-administration de cocaïne ou d'alcool, l'expression de la CYP46A réduit le comportement de recherche de drogues.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type de recherche, visant à comprendre les bases d'une maladie psychiatrique telle que l'addiction, ne peut être menée que sur un animal vivant (remplacer). Nous minimiserons le nombre d'animaux utilisés par des méthodes expérimentales validées et reproductibles. Et nous utiliserons des méthodes statistiques appropriées de type ANOVA qui nous permettront de faire des comparaisons multiples et de limiter le nombre d'animaux utilisés (réduire). Les animaux subissant une chirurgie seront traités pour de possibles douleurs post-opératoires (raffiner). Nous avons calculé que pour cette étude 280 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.

8094 La pollution environnementale représente une menace croissante pour la population. Elle est associée à de nombreuses pathologies (asthme, diabète, cancers.). Plusieurs études épidémiologiques suggèrent un effet des polluants environnementaux (dioxines, hydrocarbures.) sur la survenue de pathologies neurodégénératives, de retards de développement chez l'enfant, ou d'altérations du comportement.

Dans ce contexte, le présent projet s'inscrit dans une démarche de caractérisation de l'effet de polluants environnementaux sur le développement neurologique et le comportement.

L'objectif du projet consiste à analyser les conséquences d'une exposition périnatale par gavage hebdomadaire de mères gestantes/lactantes, suivie ou non d'une réexposition à l'âge adulte (un seul gavage), à une faible dose d'un polluant environnemental sur le développement et le fonctionnement de certaines structures du système nerveux et de l'associer à des défauts de comportement déjà mis en évidence.

La souris est le meilleur modèle pour ce genre d'étude et il n'existe pas de méthode alternative à ce modèle.

Le polluant choisi et sa dose reposent sur des résultats préalables d'expériences in vitro et de modélisation, ainsi que sur des expériences préliminaires chez la souris.

Les procédures ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible tout en garantissant l'obtention de résultats statistiquement exploitables. De plus, afin d'obtenir le maximum d'informations sans augmenter le nombre d'animaux utilisés, nous élargirons notre étude à d'autres tissus que ceux composant le système nerveux central, notamment le foie, qui joue un rôle crucial dans le métabolisme et la détoxification, et le tissu adipeux, lieu de stockage privilégié de nombreux polluants organiques persistants. Par ailleurs, nous limiterons au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux, notamment en réalisant les procédures qui le nécessitent (prélèvement de sang) sous anesthésie et en établissant des points limites. Cette étude, prévue sur 3 ans, nécessitera au total 450 souris.

A terme, les résultats de ce projet permettront de mieux comprendre l'impact d'un polluant environnemental sur l'organisme, notamment au niveau du système nerveux.

8095 Il est important de développer de nouveaux aliments aquacoles afin de produire du poisson d'élevage sans prélever des poissons en milieu naturel pour fabriquer ces farines et huiles. Il est donc nécessaire de rechercher de nouveaux ingrédients à incorporer dans les aliments (comme les plantes, les insectes, les algues.) mais le remplacement complet des farines et huiles de poisson est toujours limité par des problèmes d'utilisation métabolique de ces nouveaux aliments par les animaux. Il est donc maintenant dans nos objectifs d'essayer d'adapter le poisson aux nouveaux aliments en agissant à des stades précoces du développement au moment du premier repas lorsque les animaux sont des alevins. C'est dans ce contexte que se situe notre projet d'expérimentation.

Nous allons faire ingérer aux alevins de truite arc-en-ciel un aliment de faible teneur en protéines (et riches en amidon), ceci afin d'épargner les protéines (et de diminuer les rejets des piscicultures) par les sucres, qui sont des sources d'énergie universelles dans le monde biologique. L'idée est que le poisson puisse se souvenir de cette alimentation précoce afin d'utiliser plus efficacement des aliments à faible taux de protéines et riches en glucides lorsque le poisson sera devenu adulte.

Dans une expérience en parallèle, nous nourrirons les alevins qu'un jour sur deux afin d'induire chez les alevins une restriction énergétique temporaire (courante dans le milieu naturel car l'accès à l'aliment n'est pas toujours facile dans les rivières). Nous pensons que, comme chez les mammifères, ces périodes de restrictions énergétiques ou caloriques peuvent modifier durablement le métabolisme nutritionnel de l'adulte et lui permettre d'utiliser le plus efficacement possible les nouveaux aliments qui lui seront donnés lorsqu'ils seront devenus des poissons adultes.

Ces expériences ne pouvant pas être réalisées avec des cellules ou in vitro, 900 poissons seront élevés dans notre ferme expérimentale dans des conditions d'élevage optimales afin de garantir leur bien-être. Le nombre de poissons est calculé au plus juste au regard des analyses à mener. Une fois pêchés avec une épuisette pour les prélèvements, les animaux sont anesthésiés immédiatement dans un seau pour éviter le stress avant d'être euthanasiés avec des doses élevées d'anesthésiques.

8096 La transplantation représente un moyen thérapeutique efficace et parfois l'unique solution pour contrer le dysfonctionnement de certains organes ou pour traiter différentes pathologies comme les cancers. Cependant, le rejet de greffe n'est pas entièrement contrôlé par les immunosuppresseurs et représente aujourd'hui l'obstacle majeur en transplantation.

Au sein du laboratoire, nous étudions les mécanismes liés à la survie et au rejet de greffe à l'aide de modèles animaux. Notre équipe est plus particulièrement impliquée dans un consortium européen, qui a pour but de développer des stratégies de traitements personnalisés capables de contrôler le rejet de greffe en fonction du type de réponse immune observée chez le patient greffé. La nature de ce projet ne permet pas de s'affranchir de l'utilisation d'animaux. En effet, le même niveau d'information ne pourra être apporté par des études in vitro ou in silico.

Dans un premier temps, notre but est de reproduire les modèles de greffe de peau chez la souris NSG développés par d'autres groupes et qui seront communs aux différentes équipes impliquées dans le consortium. Dans un second temps, ces modèles nous permettront de tester des traitements immunosuppresseurs capables de contrôler le rejet de greffe. 240 animaux seront nécessaires à la réalisation de ce projet.

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

- Remplacer : Cette étude ne peut être réalisée chez l'homme sans résultat préalable. Une alternative solide à l'utilisation de primates en recherche préclinique est le modèle de souris NSG (NOD/SCID/IL2R gamma -/-) humanisées. Ce modèle est le seul moyen de mimer la réponse immune humaine complexe en contexte d'inflammation lors d'une allogreffe et d'évaluer l'efficacité d'un traitement de spécificité humaine.

- Réduire : le nombre d'animaux par groupe est réduit à 10, nombre nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Le nombre de groupe a été réfléchi de sorte à avoir les contrôles suffisants pour pouvoir conclure quant aux résultats obtenus.

- Raffiner : Les animaux atteignant une perte de poids de 20% par rapport à leur poids le plus élevé seront euthanasiés, ainsi que les animaux montrant des signes physiques caractéristiques d'un mal-être tel qu'un changement de comportement. Durant le protocole, les souris seront suivies pour leur poids, le développement de la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) et/ou le rejet de greffe. Des

prélèvements sanguins seront effectués avant l'injection des cellules humaines puis tous les 15 jours afin de suivre la prise de greffe des cellules humaines et leur persistance. Tous les animaux seront analysés afin d'en obtenir un maximum d'informations post-mortem au niveau anatomopathologique pour les lésions dans les organes dues à la réaction de GVH et dans le greffon.

Afin de limiter la douleur, la souffrance et l'angoisse infligées aux animaux au cours de cette étude, des stratégies seront mises en place :

- Lors de la réalisation de la greffe de peau, les animaux seront anesthésiés par un mélange de Kétamine 80mg/kg (Ketalar) et Xylazine 10mg/kg (Rompum 2%) injecté au préalable en IP.
- La mise en place du pansement après la greffe de peau, les injections de cellules en IV et les prélèvements sanguins seront réalisées sous anesthésie. Celle-ci sera effectuée par inhalation d'Isoflurane de 1-4%/l d'oxygène jusqu'à leur réveil (quelques minutes).
- En présence de 2 signes cliniques notables de douleur, un analogue morphinique sera administré (buprénorphine 0.05mg/kg) en sous-cutanée, 2 fois par jour.
- Lorsque les animaux présenteront 3 signes cliniques notables de douleur ou un signe clinique sévère, ils seront retirés de l'étude et euthanasiés par inhalation d'Isoflurane en surdose puis par dislocation cervicale.

8097 La listériose est une maladie causée par la bactérie *Listeria monocytogenes* (Lm), qui est présente dans l'alimentation. Cette maladie induit une mortalité élevée (30% des patients infectés) même lors d'un traitement adéquat.

La listériose se traduit par une infection materno-fœtale chez les femmes enceintes, pouvant provoquer des fausses-couches, des accouchements prématurés ou des infections néonatales. Lm peut également atteindre le cerveau et induire des méningites et encéphalites. Les mécanismes exacts ainsi que les gènes spécifiques de Lm lui permettant d'infecter le fœtus et le cerveau sont encore mal connus.

Des études génomiques et épidémiologiques ont permis d'associer certaines souches bactériennes aux infections du fœtus et du cerveau. L'objectif de ce projet est de déterminer si ces souches présentent un tropisme pour le cerveau et le fœtus et de trouver les gènes bactériens impliqués. Un modèle de souris permissive à Lm a été développé au laboratoire. Nous vérifierons que les souches d'intérêt induisent dans ce modèle des infections comparables à la listériose humaine. Nous identifierons ensuite les gènes de ces souches cliniques impliqués dans la listériose materno-fœtale et dans la neurolistériose. L'étude de bactéries invalidées pour ces gènes dans le modèle de souris et dans d'autres modèles de cultures tissulaire et cellulaires développés au laboratoire permettra d'analyser leur rôle. Nous déterminerons également quelles sont les cellules ciblées par Lm ainsi que leur devenir au cours de l'infection. De plus, nous avons mis en évidence des patients présentant des variants de gènes (allèles) potentiellement impliqués dans la susceptibilité à l'infection. Nous étudierons ces allèles chez la souris.

Nous estimons à environ 3000 le nombre de souris utilisées sur 5 ans, 2660 en classe modérée, 176 en classe sans réveil et 162 en classe sévère.

Ce projet permettra de comprendre les mécanismes impliqués dans la listériose materno-fœtale et la neurolistériose. Le bénéfice attendu est une meilleure compréhension de cette pathologie, nécessaire pour mieux la traiter et identifier les souches à risque. L'étude des mutations chez les patients nous permettra de déterminer les facteurs de risque associés au développement de pathologies infectieuses.

Certains effets néfastes sur les animaux pourront être observés suite à l'infection par Lm : poil ébouriffé, saignements utérins. Le degré de sévérité restera modéré. Les souris seront mises à mort lors des premiers symptômes de la pathologie ou à la fin de l'étude.

L'utilisation de cultures cellulaires, d'explants tissulaires sera privilégiée lorsque cela est possible pour étudier les interactions entre la bactérie et la cellule cible. Cependant, le recours à l'animal est nécessaire car ces études ne rendent pas compte de la complexité de l'infection au niveau des

différents organes et types cellulaires et ne permet d'obtenir que des informations partielles sur les mécanismes de reconnaissance et de traversée des barrières de l'hôte.

L'estimation du nombre d'animaux utilisés est basée sur l'expérience du laboratoire relative à ce type d'étude et correspond au nombre minimum nécessaire à un traitement statistique correct.

Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Les doses d'infection sont calculées pour minimiser les effets indésirables tout en permettant des observations scientifiques. Les animaux atteignant les points limites seront mis à mort.

8098 La fièvre aide à combattre les infections, notamment via l'activation du système immunitaire. L'inflammation locale est également accompagnée de chaleur, mais comment la chaleur est produite localement, et si cette chaleur locale affecte la réponse immunitaire, en particulier la réponse immunitaire humorale (médiée par les lymphocytes B), restent mal connus. Notre hypothèse est que, lors d'une réponse immunitaire, de la thermogénèse est induite localement, et favorise la réponse immunitaire B dans les centres germinatifs, qui sont spécialisés dans l'activation des lymphocytes B. Ce mécanisme pourrait jouer un rôle dans les organes lymphoïdes secondaires lors des réponses immunitaires aiguës comme les infections, mais également aux sites d'inflammation chronique dans lesquels des centres germinatifs ectopiques se développent, comme la paroi des aortes athérosclérotiques, la muqueuse intestinale dans la maladie de Crohn, ou la paroi des vaisseaux dans le rejet de greffe. Nous allons combiner des approches *in vitro* et *in vivo* afin de comprendre comment la thermogénèse est produite localement, et dans quelle mesure la thermogénèse locale impacte l'induction de la réponse immunitaire humorale. Répondre à ces questions pourrait avoir un impact dans le domaine de la vaccination : l'hyperthermie pourrait, par exemple, être utilisé comme une stratégie adjuvante (cette stratégie est déjà à l'étude dans le domaine des cancers). Nous allons aussi développer l'imagerie préclinique des lymphocytes B et de la thermogénèse, ce qui pourrait avoir un impact diagnostique chez les patients dans des pathologies infectieuses mais également d'inflammation chronique, en permettant de détecter des foyers d'inflammation actifs.

Pour mener à bien ce projet, nous utiliserons des modèles murins de souris : des souris wild-type, mais également des souris ne pouvant pas faire de thermogénèse, des souris développant de l'athérosclérose, et des souris permettant d'identifier les lymphocytes B activés. Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 1405 animaux, pour une durée de 5 ans. Nous respecterons la règle des 3R. Pour certaines expériences, des tests *in vitro* avec des lignées cellulaires seront au préalable réalisés afin de diminuer le nombre d'animaux nécessaires (remplacement). Des contrôles internes à chaque souris nous permettront également de minimiser le nombre d'animaux nécessaires pour les expériences *in vivo* (réduction). Enfin, les modèles transgéniques choisis ont des phénotypes non dommageables. Le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Les procédures engendrant de la douleur réalisées sous anesthésie (Raffinement).

8099 Dans un contexte sociétal et économique où l'avenir des productions animales est questionné, un des défis actuels est de garantir la durabilité des systèmes de production tout en assurant le bien-être animal. L'élevage porcin est fortement affecté par le problème de mortalité des nouveau-nés (20%). Ce phénomène est une des conséquences de la sélection réalisée au cours des 20-30 dernières années pour améliorer le rendement de cette filière, en combinant des caractères de qualité de viande et de taille de portée. La mortalité néonatale est donc un enjeu majeur de l'industrie porcine et un problème significatif de bien-être animal (mère et porcelets) avec un manque à gagner important pour les éleveurs dans un contexte économique difficile.

Il est important de comprendre les causes zootechniques et biologiques de cette mortalité afin d'améliorer la survie des porcelets et leur bien-être dans les schémas de sélection.

Dans ce contexte, le projet propose de définir une procédure de prélèvements biologiques adaptée aux professionnels de la sélection porcine. Le volet technique du projet consiste à identifier la meilleure procédure de collecte de sang des porcelets : la moins douloureuse pour le porcelet, la moins perturbante pour la truie pendant/après la mise bas, la plus commode et la mieux adaptée à

l'organisation du travail et au grand nombre d'animaux à analyser en sélection génétique, et robuste pour évaluer le potentiel et la qualité de survie des porcelets.

Pour répondre à ces objectifs, le projet prévoit la collecte de sang de 100 porcelets en ciblant la période critique de la naissance et des premières 24h post-natales. Ces prélèvements sanguins sont estimés comme de sévérité « légère ». Les animaux seront mesurés pour des caractères de routine comme leur poids, leur taille et leur vitalité. Les animaux seront ensuite suivis jusqu'à l'abattage pour enregistrement des caractères de production. Ce projet a été réfléchi dans le cadre du respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Des études in vitro ne peuvent être envisagées dans ce cas puisqu'il est nécessaire d'effectuer des mesures zootechniques sur les animaux et de collecter du matériel biologique pour les analyses moléculaires.

- Réduire : Le nombre minimal d'animaux, pour obtenir des données permettant d'évaluer les méthodes de prélèvement sanguin et d'associer les données moléculaires aux caractères de survie, est de 100 animaux. Les effectifs ont été évalués par une analyse statistique adaptée. Les animaux seront réintégrés à l'élevage.

- Raffiner : Ces prélèvements de sang ont été choisis pour être moins invasifs que des biopsies de muscle, tissu important dans cette problématique pour son rôle dans la mobilité et la thermorégulation. Les prélèvements sanguins seront effectués par du personnel habilité. Une attention particulière sera apportée aux animaux les plus légers donc les plus fragiles en prélevant un volume sanguin réduit de quatre ml (0,3% du sang total).

8100 Les affections ostéoarticulaires chroniques ou rhumatismales sont la première cause de morbidité au monde en touchant environ 20% de la population et tout particulièrement les adultes de plus de 50 ans. Ces pathologies fortement invalidantes se manifestent de façon aiguë et chronique par de l'inflammation entraînant des douleurs intenses et des pertes de fonctionnalité. Les deux maladies rhumatismales les plus fréquentes sont l'arthrose ou ostéoarthrite et l'arthrite rhumatoïde (AR).

L'arthrose est causée par la dégénération des articulations due à une usure progressive du cartilage. En plus de cette usure, l'arthrose est associée à un remodelage des os sous cartilagineux, la formation d'excroissances osseuses (les ostéophytes), un affaiblissement des ligaments et des muscles et dans les cas les plus sévères, une inflammation articulaire. L'arthrite rhumatoïde est une maladie chronique auto-immune caractérisée par des poussées inflammatoires touchant de façon progressive de nouvelles articulations. Ces poussées inflammatoires sont associées à une invasion leucocytaire de la synoviale, à des destructions osseuses et cartilagineuses ainsi qu'à un remodelage articulaire anarchique.

Les traitements des maladies rhumatismales sont basés principalement sur le soulagement de la douleur intense et de l'inflammation : traitements antalgiques et analgésiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens ou anti-inflammatoire de type corticoïdes, des traitements immunosuppresseurs ou encore les biothérapies ciblant les cytokines pro-inflammatoires. Si l'inflammation peut être contrôlée chez certains patients, il n'existe malheureusement à ce jour, aucun traitement permettant de guérir les rhumatismes notamment la douleur chronique ou la dégradation du cartilage. Cela s'explique par une variabilité des manifestations cliniques entre chaque patient. La mise au point de nouveaux traitements permettant d'agir de façon globale contre les rhumatismes chez l'ensemble des patients est donc une urgence médicale.

Notre société développe des molécules bifonctionnelles associant chimiquement une partie HBP (hydroxybisphosphonate) à des molécules chimiques possédant des activités antirhumatismales. De par sa forte affinité pour le tissu osseux articulaire, l'HBP permet d'y vectoriser différents types de molécules chimiques en augmentant leurs concentrations locales tout en diminuant leur concentration circulante (souvent responsable d'effets secondaires). De plus, l'HBP peut être confectionné à façon pour bloquer l'activité ostéorésorptive associée aux pathologies rhumatismales.

Ce projet a donc pour but de développer des nouvelles molécules pouvant cibler un maximum d'effets pathologiques liés aux rhumatismes tels que l'inflammation, l'atteinte osseuse et l'atteinte cartilagineuse.

Les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées in vitro puis in vivo. L'objectif de ces études précliniques est de sélectionner 6 futurs candidats thérapeutiques.

Ce projet est divisé en 3 étapes:

Procédure expérimentale n°1 : Les molécules retenues pour les tests in vivo seront tout d'abord administrées à des souris puis à des rats sains à différentes concentrations dans le but de déterminer la dose maximale tolérable et de choisir la dose qui sera ensuite utilisée lors des tests d'activité. La procédure 1 comptera au maximum 648 souris et 108 rats.

La procédure expérimentale n°2 : Optimisation de 4 modèles de pathologies rhumatismales chez la souris et/ou le rat afin de récapituler l'ensemble des affections liées aux rhumatismes chez l'homme. La procédure 2 comptera 105 souris et 90 rats.

Procédure expérimentale n°3 : Nous évaluerons l'efficacité des différentes molécules sur les quatre modèles de pathologies rhumatismales. Six molécules seront sélectionnées d'abord chez la souris puis chez le rat selon le modèle. Les molécules seront retenues pour leur efficacité contre l'inflammation, la résorption osseuse et la résorption cartilagineuse. La procédure 3 comptera au maximum 2100 animaux. Sur 5 ans, nous utiliserons un maximum de 3051 animaux.

Nos études seront planifiées pour respecter au mieux la règle des 3R pour : Remplacer, réduire, raffiner.

Ainsi pour améliorer la possibilité de remplacer, les molécules synthétisées seront dans un premier temps testées in vitro afin de comparer leur cytotoxicité par rapport aux molécules natives et de leur efficacité sur des modèles cellulaires d'inflammation et sur des explants de cartilage ce qui permettra de réduire le nombre de candidats à tester in vivo.

Pour améliorer la possibilité de réduire, les tests d'efficacité des molécules seront dans la mesure du possible regroupés afin de limiter le nombre d'animaux, en utilisant un même groupe contrôle pour comparer plusieurs molécules bifonctionnelles. De plus le nombre d'animaux a été réduit au minimum afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, permettant de conclure de manière certaine, sans nécessité la réalisation d'une deuxième étude.

Pour améliorer la possibilité de raffiner, nous mettrons en place de mesures spécifiques et adaptées aux douleurs occasionnées par les rhumatismes pour éviter toute souffrance inutile et prolongée : les conditions d'hébergement seront optimisées (litière spécifique, augmentation de l'enrichissement, facilité d'accès à l'alimentation), nous utiliserons un anesthésique et des tapis chauffants lors de l'induction de la pathologie, des traitements antalgiques post-induction et dès l'apparition des premiers signes inflammatoires. Un suivi quotidien des animaux sur des caractéristiques spécifiques (température, gonflement, locomotion, sensibilité mécanique et thermique) seront effectués. Tout animal ayant atteint un des points limites (repéré le plus précocement possible grâce à un suivi quotidien) sera euthanasié. Nous maintiendrons les animaux le minimum de temps dans une situation de douleur (lors du traitement expérimental et lors des prises de mesures). Dans la mesure du possible, la prise de mesures sera effectuée uniquement dès l'apparition de la première phase de douleur aiguë et celle-ci sera limitée à une semaine.

A terme, les meilleurs candidats devront ensuite faire l'objet d'études précliniques complémentaires réglementaires répondant aux guidelines ICH (International Council for Harmonisation), afin de retenir une molécule qui pourra alors être administrée chez le patient dans le cadre d'essais cliniques. L'objectif final étant de proposer de nouvelles solutions thérapeutiques aux patients atteints de rhumatismes.

8101 Les maladies chroniques intestinales, incluant la recto-colite hémorragique et la maladie de Crohn, ont un effet dévastateur sur la qualité de vie des patients. L'origine de ces maladies reste inconnue et de ce fait, les traitements manquent de précision et d'efficacité. Dans ce contexte, ces maladies progressent tout au long de la vie du patient et réduisent drastiquement la probabilité de pouvoir mener une vie active et autonome jusqu'à la vieillesse. Une série d'observations suggère que ces maladies sont liées à une hypersensibilité du colon à l'alimentation et au microbiote lié à la vie moderne. La cause de cette hypersensibilité reste inconnue. Dans une étude préliminaire, les laboratoires associés à ce projet ont identifié une protéine régulatrice de l'expression des gènes. Cette protéine exprimée dans les cellules qui entretiennent l'intégrité de la paroi du côlon, favorise la

croissance cellulaire tout en réduisant leur sensibilité aux agressions. Dans ce contexte, nous désirons créer un modèle souris dans lequel il est possible d'arrêter la production de cette protéine dans les cellules de l'intestin et ainsi évaluer son impact sur l'état inflammatoire des tissus.

540 souris seront utilisées sur 3 ans dans deux procédures de sévérité légère et modérée, respectivement.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des mécanismes déclencheurs des maladies chroniques intestinales et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Dans notre démarche, nous arrêterons la production de la protéine d'intérêt pendant une période d'au maximum 14 jours avant la mise à mort des animaux. Pendant cette période, nous prévoyons quelques effets néfastes pour les animaux. En particulier, nous anticipons plusieurs symptômes observés chez les patients souffrant de maladies chroniques intestinales dont des douleurs au niveau du tube digestif et de la diarrhée. Il est possible que nous observions également un retentissement sur l'état général de l'animal, notamment de l'amaigrissement et une baisse de la vitalité. Enfin, des expériences réalisées avec des souris similaires ont mis en évidence une sensibilité accrue aux infections. Si nous observons chez un animal des signes de dégradations de l'état général avant la fin des 14 jours d'expérience, nous le mettrons à mort immédiatement pour ensuite l'examiner.

Le recours à l'animal est nécessaire car nous désirons observer l'effet de la protéine d'intérêt dans un milieu naturel où les cellules du tube digestif sont confrontées aux aliments dégradés et aux bactéries participant à la digestion. Recréer ces conditions en laboratoire serait impossible.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous consultons un biostatisticien avant chaque expérience pour être sûrs d'utiliser le nombre d'animaux le plus faible possible sans compromettre la validité des conclusions.

Dans ce contexte, il faut préciser que nous avons très largement réduit le nombre d'animaux nécessaire à cette étude en utilisant des « mini-côlons » cultivés in vitro dans tous les cas où cela semble possible. Ces mini-côlons sont produits à partir de cellules prélevées après la mise à mort des animaux. Cette démarche ne nécessite pas l'arrêt de la production de la protéine d'intérêt et les animaux ne subissent donc aucune intervention ni souffrance jusqu'à leur mise à mort.

Enfin, les souris potentiellement immunodéprimées seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

8102 Notre laboratoire étudie le rôle de la diversité génétique dans la pathogenèse virale des virus à ARN. La réplication de l'ARN viral se fait avec des taux de mutation élevés ce qui crée un « nuage » de mutations, qui permettent aux populations virales une plus grande probabilité d'évolution et d'adaptation. Pour vérifier ces hypothèses in vivo, nous avons développé des méthodes pour augmenter ou diminuer le taux de mutation des virus à ARN, changeant ainsi les niveaux de diversité génétique. Nous avons montré que la diminution ou l'augmentation des niveaux de diversité virale sauvage, conduit à une perte de dissémination virale et de tropisme ainsi qu'à un phénotype atténué chez les animaux infectés. Ces découvertes suggèrent que la diversité des populations virales soit biologiquement déterminante pour le devenir de l'infection. Nous travaillons sur le virus de Coxsackie B3 (CVB3). Nous avons isolé ou généré des virus qui présentent une diversité génétique accrue ou réduite, qui nous permettent d'étudier l'évolution du virus lors de l'infection de l'hôte (chez la souris). Nous allons utiliser ces souches virales à la fois comme outils pour suivre l'évolution naturelle du virus et pour déterminer leur potentiel en tant que candidats vaccinaux. Les bénéfices attendus du projet sont a) l'identification de souches avec un tropisme spécifique pour certains organes, qui nous permettra de mieux cibler des approches antivirales et b) le développement d'une nouvelle approche d'atténuation virale qui pourrait être adaptée au sens large à d'autres virus à ARN.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'évolution virale en culture cellulaire ne reproduit pas ce qu'il se passe au sein d'un hôte infecté et la confirmation d'atténuation virale nécessite un modèle animal. En revanche, seules les souches qui présentent des profils prometteurs en culture cellulaire (diversité génétique accrue ou réduite de manière significative) seront caractérisées chez l'animal. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles ou mâles adultes. Un maximum de 900 souris sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos précédentes études et analyses statistiques nous

permettent de limiter le nombre de souris à 5 pour chacun de nos groupes expérimentaux (30 groupes pour 6 souches virales par an sur 5 ans) et temps d'analyse (3 temps : 3, 5 et 7 jours post-infection). Nous dupliquerons nos expériences.

Nous allons étudier les souches de CVB3 à la suite d'une infection sous-létale par une injection unique et rapide en intra-péritonéal. La douleur ressentie par l'animal lors de l'injection se limitera à une simple piqûre d'aiguille. L'infection sous-létale est asymptomatique, mais pourrait occasionner une légère fatigue ou léthargie. Les souris seront suivies quotidiennement pendant les 7 jours d'infection. Le niveau de sévérité attendu est modéré. Nous avons déterminé précédemment que l'infection létale/symptomatique n'est pas nécessaire pour atteindre nos objectifs scientifiques, car la quantification de la charge virale après infection sous-létale est suffisante pour suivre l'évolution du virus et déterminer l'atténuation des candidats vaccinaux. Les souris seront mises à mort avant le prélèvement d'organes pour déterminer la charge virale.

8103 Le diabète est à l'origine de la formation anormale de vaisseaux sanguins (processus d'angiogenèse) pouvant avoir de graves conséquences sur la santé. Ces anomalies conduisent en effet à des atteintes de l'œil (rétinopathie) et du rein (néphropathie), ainsi qu'à des problèmes de perfusion des tissus situés aux extrémités (au niveau du pied notamment). A ce jour, il n'existe pas de traitement satisfaisant pour contrer ces atteintes qui atteignent, selon l'organe touché, entre 20 et 60% des patients diabétiques. La protéine que nous étudions, la PN-1, est présente dans les vaisseaux et est connue pour agir sur l'angiogenèse. L'hypothèse de notre groupe de recherche est que la PN-1 pourrait avoir une part de responsabilité dans le développement des pathologies associées au diabète et pourrait donc être une cible à visée thérapeutique.

Les travaux de ce projet ont pour but de déterminer si, en modifiant l'angiogenèse, la PN-1 présente dans les vaisseaux influe sur le développement des complications du diabète. A l'aide de modèles de diabète de type 1 et de type 2, nous évaluerons si sa production est augmentée dans les vaisseaux incriminés au cours de la maladie et testerons son influence sur les réponses délétères des tissus touchés.

Ce projet permettra de déterminer si la PN-1 pourrait représenter une cible thérapeutique de choix pour lutter contre l'apparition des manifestations cliniques du diabète. Dans le respect des 3R, les animaux seront maintenus sans isolement, les cages seront changées deux à 3 fois par semaine pour éviter que les souris soient dans l'humidité. Les cages seront équipées d'enrichissement afin d'éviter tout stress supplémentaire et l'entretien des animaux sera fait par des personnes compétentes et expérimentées.

Afin d'atteindre les objectifs du projet, le recours aux animaux est indispensable. En effet, la néphropathie et rétinopathie diabétiques mettent en jeu des mécanismes intégrés et pluricellulaires ne pouvant être reproduits in vitro. De plus, cette étude nécessite des modèles murins génétiquement modifiés n'exprimant pas la PN-1. Dans ce projet nous utiliserons 300 souris afin de pouvoir faire les études statistiques indispensables.

8104 Le projet a pour but de fournir des données supplémentaires sur l'efficacité d'un médicament antibiotique vétérinaire autorisé pour le traitement des maladies respiratoires porcines (MRP) d'origine bactérienne.

La lutte contre l'antibiorésistance est un défi majeur et mondial de santé publique. Une évaluation du bilan risques/bénéfices des médicaments antibiotiques vétérinaires est nécessaire. Après l'obtention de l'autorisation de marché d'un médicament antibiotique vétérinaire, certaines études sont nécessaires pour approfondir les connaissances des antibiotiques en termes d'efficacité, aussi bien clinique que bactérienne et de montrer l'impact de cette utilisation sur la résistance bactérienne.

Objectifs :

Ce projet possède un objectif scientifique couplé à un objectif de Santé Publique.

Le but de ce projet est de fournir des données supplémentaires sur l'efficacité d'un médicament antibiotique vétérinaire autorisé pour le traitement des MRP d'origine bactérienne chez le porc afin de conseiller les utilisateurs sur la prescription raisonnée de cet antibiotique.

Avantages et dommages :

La finalité de ces études est une meilleure utilisation de ce médicament antibiotique vétérinaire afin, d'une part protéger les animaux contre les maladies infectieuses et d'autre part, de diminuer l'antibiorésistance.

Le développement de la maladie peut donner lieu à des signes cliniques sévères provoquant une douleur chez l'animal. C'est pourquoi, des points limites spécifiques aux MRP sont appliqués. De plus, l'administration du pathogène et les prélèvements peuvent également générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés.

Informations sur les espèces utilisées :

Les études de ce projet seront réalisées sur l'espèce cible (le porc) au plus proche des conditions réelles de la maladie et des conditions d'utilisation de ce médicament antibiotique vétérinaire. Jusqu'à 320 porcs seront utilisés sur 5 ans.

Mise en œuvre des 3Rs

Remplacement : Seules les études in vivo permettent de confirmer l'activité du médicament testé sur les manifestations cliniques et la présence bactérienne chez l'espèce-cible.

Réduction : Les effectifs sont réduits par rapport aux études réglementaires et déterminés (bibliographie, guidelines, historique, définition des objectifs, tests statistiques de puissance...) de façon à limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en garantissant une approche rigoureuse et ceci afin d'éviter les études non conclusives.

Raffinement : Pour chaque étude, une période d'acclimatation systématique des animaux est prévue dans le but de limiter leur stress. En cas d'administrations et/ou de prélèvements répétés, une anesthésie et/ou analgésie seront mis en place si nécessaire. Des points limites spécifiques aux MRP ont été définis afin de limiter le plus précocement possible une dégradation de l'état général des animaux. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires.

Le personnel est également formé et compétent pour identifier les cas pour lesquels l'animal n'est plus dans son état physiologique optimal. Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux afin de maximiser leur confort et leur bien-être. Les animaux sont hébergés en groupe et des enrichissements du milieu (chaînes métalliques suspendues et des bouts de tuyaux) sont installés dans les hébergements. La Structure en charge du Bien-Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie pour les animaux.

8105 Il existe différents sous-types de cancers du sein. Les plus fréquents expriment à la surface des cellules les récepteurs aux hormones féminines : les œstrogènes et la progestérone ; ils sont traités par hormonothérapie. Environ 15% des cancers du sein expriment à la surface des cellules tumorales une protéine appelée HER2 que l'on peut cibler avec un traitement spécifique mais pour lequel de nombreuses résistances sont observées. Enfin, il existe un autre type de cancers du sein plus rare, appelé triple-négatifs, pour lequel l'arsenal thérapeutique est le plus limité et qui présente le pronostic le plus sombre.

Une étude récente suggère qu'un anti-inflammatoire pourrait avoir un effet anti tumoral uniquement dans les cancers colorectaux présentant un statut mutationnel particulier.

Nous souhaitons tester cette hypothèse sur des tumeurs mammaires HER2+ et présentant ce même statut mutationnel. Deux lignées tumorales mammaires de sous-type HER2 ont été sélectionnées. Nous avons observé in vitro une augmentation significative de la mortalité cellulaire pour la lignée traitée avec un anti-inflammatoire et possédant la mutation alors qu'aucun effet anti tumoral significatif n'a été observé pour la lignée qui ne présente pas la mutation.

Cependant la culture cellulaire ne permet pas de reproduire la complexité du cancer telle que dans l'organisme. Il est donc nécessaire de passer à un modèle animal qui permettra de mieux comprendre les effets de l'anti-inflammatoire sur la tumeur et sur les paramètres physiologiques à l'échelle de l'organisme entier.

Les expérimentations ont été conçues afin d'utiliser le moins d'animaux possible (40 souris au total) tout en permettant de réaliser des études statistiques. Les animaux seront suivis en accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux.

Ce travail pourrait avoir des retombées thérapeutiques en clinique dans le sens où il pourrait aider à identifier un sous-groupe de patients présentant un cancer du sein et qui pourraient bénéficier d'un anti-inflammatoire.

8106 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie neurodégénérative progressive qui est caractérisée dans ses stades précoces par des altérations de la mémoire en relation avec des déficits de la plasticité synaptique dans l'hippocampe, une zone cérébrale clé dans l'encodage et le traitement de différentes modalités mnésiques. Ce projet concerne la comparaison des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans l'encodage rapide d'une mémoire de type épisodique chez la souris contrôle et chez des souris modèles de la MA. Ce projet utilise des approches fonctionnelles (électrophysiologie) et comportementales. Il fait appel au transfert de gènes *in vivo* et à l'utilisation, de souris génétiquement modifiées comme modèles de la MA.

Le planning général des expériences comprend plusieurs étapes : 1) la chirurgie stéréotaxique pour le transfert de gène localisé dans l'hippocampe chez des souris contrôle et modèle de la MA, 2) des expériences de comportement de conditionnement 3) un prélèvement de tissu vivant après anesthésie pour pouvoir réaliser des analyses électrophysiologiques sur tranche des circuits de la mémoire.

Dans ce projet, nous utiliserons un nombre total de 940 souris.

Dans le respect de la règle des 3R (Réduction, Raffinement, Remplacement) les mesures suivantes seront prises : (1) Le même animal sera utilisé pour différents protocoles électrophysiologiques afin de réduire le nombre total (réduction); (2) Les protocoles comportementaux seront suivis par des analyses immunohistochimiques afin de réduire et d'optimiser l'utilisation des animaux (réduction et raffinement) et (3) L'utilisation de systèmes simplifiés (neurones en cultures ou lignées cellulaires) ne peut reproduire cette évolution lente de la maladie. Les études électrophysiologiques dans un circuit neuronal "intact" *ex vivo*, combinées à des expériences de comportement nécessitent de facto l'utilisation d'un modèle murin. La souris est une espèce de choix pour les études sur le système nerveux central des Vertébrés. L'organisation du système central de cette espèce est assez proche de celle de l'homme, ce qui permet une extrapolation des résultats obtenus. Nous utilisons le modèle souris qui est l'espèce de rongeurs permettant d'obtenir aisément des animaux modifiés génétiquement. Le modèle utilisé ici n'a pas de phénotype dommageable. L'anesthésie pour les chirurgies sera faite avec les molécules les plus adaptées aux procédures, de même que la gestion de la douleur post-opératoire par injection de molécules analgésiques. Le confort de l'animal sera pris en compte à tout moment et des points limites sont définis.

8107 La thématique de recherche relative à ce protocole porte sur un mode d'exposition spécifique à certaines situations professionnelles. Ce projet a pour objectif d'étudier les risques encourus par le biais d'une voie de contamination récemment identifiée, la voie olfactive, qui jusqu'à présent a été peu étudiée. Le développement de ce projet apportera de nouvelles informations sur les effets biologiques de l'uranium dans le cerveau après exposition à une atmosphère contaminée par des particules d'uranium et ainsi permettre à plus long terme la mise en œuvre de nouvelles normes de radioprotection.

Afin de mimer une situation d'exposition réaliste à laquelle un homme pourrait être soumis, il apparaît pertinent d'utiliser un modèle *in vivo*. Ceci est particulièrement vrai dans la mesure où l'étude met en jeu une voie de transfert « nez-cerveau » et ses effets biologiques associés, une situation dynamique difficile à mettre en œuvre par des expérimentations *in vitro*. L'espèce choisie est le rat car l'anatomie de son système olfactif et de son cerveau est suffisamment proche pour formuler une hypothèse extrapolable à l'homme à partir des résultats obtenus. Pour cela, une première étape d'adaptation des animaux et de mise au point des expérimentations est nécessaire. Pour ce faire, des expériences

à l'aide d'un aérosol inerte sont réalisées sur 12 rats Sprague-Dawley afin de permettre aux expérimentateurs de définir les meilleures conditions expérimentales pour les futurs projets.

En complément, 64 rats Sprague-Dawley sont exposés à l'uranium par instillation nasale afin d'évaluer différents paramètres biologiques liés à l'inflammation cérébrale et la survie des neurones.

La conception des protocoles répond aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement relatives à l'expérimentation animale. La question scientifique posée dans ce protocole vise à étudier les effets biologiques suite au passage de l'uranium par une voie de passage directe de la cavité nasale vers le cerveau. Cela nécessite de réaliser des expériences in vivo sur le rat car il n'existe pas de modèle de cultures cellulaires permettant d'étudier ces effets sur le cerveau entier. Les animaux intégrés dans ce protocole sont habitués progressivement aux procédures ce qui réduit significativement leur stress. Enfin, le nombre de rats choisi pour ce protocole est réduit mais suffisant pour exploiter les résultats obtenus d'un point de vue statistique.

Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum l'inconfort ou le stress chez les animaux (suivi des animaux pendant et après les procédures, hébergement en groupe avec enrichissement, habitude progressive et préalable aux tubes de contention).

8108 Une nouvelle technique pharmacogénétique a été récemment développée, technique qui permet d'activer ou d'inhiber spécifiquement des populations de cellules dans le cerveau. Cette technique repose sur l'utilisation des DREADDs (designed receptors exclusively activated by designer drugs). Ces récepteurs sont des récepteurs muscariniques qui ont subi une mutation de telle sorte qu'ils ne sont plus activés par leur ligand endogène, l'acétylcholine, mais par un composant inerte la clozapine-N-Oxide (CNO). L'intérêt de cette technique est qu'il est possible par une simple injection intrapéritonéale de CNO d'activer des populations cellulaires dans le cerveau préalablement infectées avec des DREADDs. Depuis le premier article scientifique utilisant cette technique publiée en 2007, environ 800 articles ont été publiés avec des DREADDs. Or, un article récent publié dans "Science" démontre que le CNO passe difficilement la barrière hémato-encéphalique et de ce fait qu'une très petite quantité de CNO injecté intrapéritonéalement agirait sur le cerveau. De plus le CNO se reconvertirait en clozapine, un agoniste connu des récepteurs dopaminergiques et pour son action anxiolytique. Enfin il a été montré que les récepteurs DREADDS auraient beaucoup plus d'affinité pour la clozapine que pour le CNO.

Sachant que de nombreuses compagnies pharmaceutiques délivrent le CNO et ceci à des prix allant du simple au double et que le CNO est 10 fois plus cher que la clozapine, cette étude a pour but de comparer l'effet de CNO issus de différentes compagnies et de la clozapine sur l'activation des différents DREADDs que l'on utilise dans le laboratoire chez le rat.

Cette étude utilisera 96 rats mâles adultes. Ces animaux seront injectés avec les récepteurs DREADDs au niveau du cerveau. Puis les animaux recevront une injection intrapéritonéale de CNO ou de clozapine afin d'activer ces récepteurs. Enfin, nous étudierons l'activité ces cellules ayant été infectées par les DREADDs par des techniques d'imagerie.

Afin de respecter la règle des 3R, des procédures seront développées de façon à réduire au maximum le nombre et l'inconfort des animaux. Notamment, dans un souci de respect du R de réduire, nous prévoyons un maximum de 8 rats par groupe, nombre minimal nécessaire pour faire des analyses statistiques cohérentes. Aussi, dans le respect du R de raffiner, un soin particulier sera accordé à l'observation des animaux et à leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post-chirurgicales. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, antidouleur) seront utilisés pour pallier la douleur associée aux manipulations d'injections. En ce qui concerne le remplacement, il est important de noter que cette étude nécessite la visualisation et l'intégrité d'un réseau englobant différentes régions du cerveau et qu'il ne peut donc être réalisé sur des modèles in vitro.

8109 L'infection au parasite unicellulaire *Toxoplasma gondii*, à l'origine de la toxoplasmose, est la première cause infectieuse d'inflammation rétinienne chez l'Homme. Le parasite persiste pendant toute la vie de son hôte dans des organes spécifiques comme muscle, cerveau ou l'œil. La présence des kystes

toxoplasmiques dans l'œil, contenant des formes dormantes du parasite, constitue un risque de réactivation et donc d'une diminution de la vision, et ceci à vie. Or, les mécanismes physiopathologiques de cette maladie sont mal connus. Ceci est avant tout dû à la difficulté d'accès aux yeux humains. Ces contraintes rendent difficile de trouver un consensus sur le traitement. Notre recherche vise à trouver des cibles spécifiques pour l'intervention médicale.

Pour des raisons évidentes, le modèle humain ne peut pas être étudié en grand détail, même si des travaux précédents ont réussi à tirer des conclusions importantes de l'analyse de cytokines dans l'humeur aqueuse des patients. Pour remplacer des expériences chez l'animal, des modèles ont été établis *in vitro* pour des questions à l'échelle cellulaire. A cause de la grande complexité du système oculaire, les expérimentations animales restent nécessaires pour étudier les mécanismes physiopathologiques. Lors de ce projet, un modèle murin adapté à l'étude de l'impact de la toxoplasmose sur la rétine sera utilisé. Ces souris infectées ont comme caractéristique de survivre sans développer de signes sévères de maladie, mais des lésions détectables de la rétine.

Le but de notre recherche est de comprendre les mécanismes liés à la réactivation locale du parasite lors d'une infection chronique à différentes échelles en couvrant différents aspects physiopathologiques de la toxoplasmose oculaire : anatomiques, fonctionnels, physiologiques, immunologiques... Ceci devrait permettre de modéliser les réactivations de la toxoplasmose oculaire chez l'Homme, la complication la plus redoutée car elle est cécitante par destruction de la rétine. Cette approche devrait in fine permettre le développement des interventions cliniques ciblées. Le projet ici reprend une petite partie de notre recherche globale et vise à introduire et utiliser une technique qui permet de réduire considérablement le nombre de souris, car la même souris est utilisée plusieurs fois pendant le cours d'infection avec une technique non-irradiante et non-invasive, donc peu stressante : l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique).

Le projet ici décrit seulement la partie IRM. La partie hébergement et infection, effectuée dans un autre centre de recherche, est décrite par un projet séparé. Pour ces expériences, les souris, infectées comme décrit dans le projet 'hébergement et infection' sont soumises à une IRM, sous anesthésie. Pour profiter pleinement des possibilités de l'IRM, plusieurs phénomènes induits par la pathologie sont étudiés, nécessitant la formation de trois sous-groupes pour l'IRM. Selon les phénomènes, les souris sont injectées avec un agent de contraste, à base de fer ou de manganèse, avant l'IRM. Elles sont ensuite retournées dans l'autre centre de recherche sauf dans le cas d'examens IRM rapprochés. Chaque souris est suivie avant puis à différents stades de l'infection par IRM. Le protocole entier dure environ deux mois.

84 souris par expérience seront utilisées pour l'étude longitudinale par IRM de ce projet, réparties dans trois groupes d'infection :

- un groupe de souris avec une réactivation oculaire de la toxoplasmose
- un groupe contrôle avec une première infection
- un groupe contrôle sans infection

Pour des raisons de variabilité entre différentes infections, cette expérience sera répétée 3 fois ($n=3$), donc avec 252 souris.

A cela s'ajoutent encore 20 souris pour la mise au point des paramètres IRM. Au total, 272 souris sont donc demandées.

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

- Réduire : L'utilisation de techniques non invasives comme l'IRM et les fonds d'œil, nous permet de réduire le nombre de souris utilisées. Pour ce projet, le nombre de souris utilisées a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des conclusions statistiquement significatives.
- Raffiner : Enrichir l'environnement des animaux, former des groupes sociaux. Lors de nos précédentes études sur ce modèle, nous avons affiné les manipulations nécessaires pour garantir le bien-être des animaux dans la mesure du possible.
- 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.

8110 Le développement de nouveaux produits pharmaceutiques bénéficie de progrès continus dans la recherche biomédicale à la fois pour les adultes et pour les enfants. Certaines maladies sont spécifiques à l'enfant et d'autres durent toute la vie, mais doivent être traitées dès le début de l'enfance. L'évaluation de la sécurité des nouveaux médicaments pédiatriques est assurée par la conduite d'études toxicologiques sur des animaux juvéniles. Afin de

refléter les effets physiologiques, ces études ne peuvent pas être conduites in vitro. Aujourd'hui, le mini-porc est considéré comme une espèce non rongeur, alternative fondamentale et à part entière pour les tests de sécurité des produits pharmaceutiques. Le mini-porc est donc une espèce à retenir pour l'évaluation toxicologique réglementaire des médicaments. Les parallèles entre l'homme et le mini-porc sont nombreux : anatomie, physiologie et biochimie. Ces parallèles sont d'autant plus vrais concernant le système cardiovasculaire, le tube digestif, le système urogénital, le métabolisme des médicaments et la peau. Pour les études de toxicologie juvénile, le développement des organes ou systèmes principaux du mini-porc (y compris le système immunitaire) nécessite encore une caractérisation plus poussée. Bien que le système immunitaire du porc adulte ait été étudié, notamment dans le cadre des maladies infectieuses chez les porcs et les xénotransplantations, le développement du système immunitaire chez les porcs juvéniles est encore peu connu.

Le but de ce projet est de cribler et d'identifier les populations de cellules immunitaires dans la peau de mini-porc durant le développement post-natal, de la naissance jusqu'à l'âge adulte (6 mois). Ainsi, nous allons déterminer la présence, dans le derme et l'épiderme (peau), de différentes populations de cellules immunitaires. L'étude de la peau des mini-porcs va être réalisée dans des conditions physiologiques ou inflammatoires sur 6 portées, soit un total de maximum 50 animaux. Des biopsies de peau des mini-porcs et des prises de sang vont être réalisées puis analysées par différentes techniques d'analyses biologiques. A l'issue des autopsies aux différents âges définis, des prélèvements d'organes lymphoïdes et de peau seront également effectués puis analysés par les mêmes techniques d'analyses biologiques. Tout au long du projet, les animaux seront socialisés et feront l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. Les animaux sont hébergés selon les standards en vigueur pour la durée du projet. Ils font l'objet d'une surveillance quotidienne sous le contrôle d'un vétérinaire. En cas de signes cliniques ayant des répercussions sur le bien-être animal, des mesures rapides et appropriées seront prises par le vétérinaire et/ou le directeur d'étude pour maximiser le bien-être des animaux. Ces études sont réalisées dans un objectif de progrès scientifique avec des conséquences positives sur l'Homme. Elles permettent un gain potentiel en terme de connaissances diverses. Elles sont dommageables en ce qui concerne les souffrances plus ou moins importantes de l'animal ainsi que sur le nombre d'animaux utilisé, c'est pourquoi l'intervention des Vétérinaires, du Directeur d'études et de la Structure de Bien-Être Animal (SBEA) est indispensable afin de réduire les dommages en respectant la règle des 3R. En outre, les animaux bénéficient d'un programme d'enrichissement.

8111 Les ribosomes sont des machines subcellulaires qui assurent l'intégralité de la synthèse des protéines dans chaque cellule de l'organisme. La synthèse de ces ribosomes est donc un processus fondamental, universel et finement contrôlé. De nombreuses études en culture cellulaire ont mis en évidence un lien robuste entre la synthèse des ribosomes et la formation de tumeurs. En particulier, l'inhibition de la synthèse des ribosomes à l'aide de molécules chimiques provoque l'activation de gènes suppresseurs de tumeurs. Cette approche, testée à ce jour essentiellement in vitro, semble prometteuse mais doit encore être validée dans des systèmes physiologiquement pertinents.

Le but de cette étude est d'évaluer in vivo l'impact de l'inhibition de la synthèse des ribosomes sur l'épithélium intestinal en cours d'initiation tumorale. Pour cela, nous utiliserons des souris transgéniques dans lesquelles des gènes inhibant la tumorigenèse et des gènes nécessaires à la synthèse des ribosomes peuvent être inactivés simultanément dans l'épithélium intestinal, afin d'évaluer les conséquences des altérations de la production des ribosomes sur la tumorigenèse.

Cette étude a un double objectif :

1) Tester l'efficacité d'une stratégie thérapeutique in vivo, ce qui implique d'évaluer le bénéfice réel de cette stratégie pour la santé de l'individu, et rend donc le recours à l'animal nécessaire.

2) Accéder à une meilleure compréhension à l'échelle moléculaire des interactions entre synthèse des ribosomes et initiation de la tumorigenèse dans l'épithélium intestinal.

Sur une période de 5 ans, nous prévoyons l'utilisation de 310 souris adultes (âgées de 5 à 8 semaines, sans distinction de sexe) dans quatre procédures de classe modérée (chaque souris ne subissant qu'une seule procédure).

La première procédure a pour but de caractériser de façon détaillée les processus résultant immédiatement de l'inactivation des différents gènes que nous étudions, à l'échelle cellulaire et moléculaire.

La deuxième procédure a pour but d'étudier spécifiquement l'impact à plus long terme de l'inhibition de la synthèse des ribosomes sur la prolifération ou l'élimination des cellules cancéreuses.

La troisième procédure a pour but d'étudier spécifiquement l'impact de la tumorigenèse sur la synthèse des ribosomes et l'impact de l'inhibition de cette synthèse sur le contenu en ribosomes actifs des cellules cancéreuses.

La quatrième procédure a pour but de déterminer si l'inhibition chimique de la synthèse des ribosomes produit les mêmes effets que l'inactivation de gènes essentiels dans un contexte de tumorigenèse.

Le nombre de souris utilisé est basé sur un plan expérimental stéréotypé permettant d'obtenir la puissance statistique nécessaire à l'obtention de conclusions biologiquement pertinentes en utilisant des tests statistiques adaptés à chaque mesure pour réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires pour chaque procédure. Le modèle murin étudié étant un modèle d'initiation tumorale, les procédures mises en œuvre occasionneront aux animaux une perte de poids liée à la prolifération de cellules précancéreuses dans l'intestin. Cependant, l'étude sera menée à des stades précédant l'apparition typique de signes cliniques de souffrance. Malgré tout, les animaux seront surveillés quotidiennement (état général, pesée), en plus de la surveillance de routine effectuée par le personnel d'animalerie, de sorte que nous garantissons que les expériences seront immédiatement interrompues sur chaque souris présentant des signes cliniques de souffrance.

8112 Au sein des pathologies cardiométaboliques telles que l'obésité, le syndrome métabolique ou le diabète de type 2, les causes les plus importantes de mortalité sont les atteintes cardiovasculaires. Le risque de développer un infarctus du myocarde et/ou une insuffisance cardiaque est plus élevé chez les patients diabétiques de type 2 que chez les personnes non diabétiques. Il est également reconnu que les femmes diabétiques ont un risque plus élevé de développer un accident cardiovasculaire que les hommes diabétiques. Peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'effet du genre dans les complications cardiovasculaires induites par le diabète de type 2 et l'obésité qui lui est souvent associée. Le but de notre travail est dans une première phase, d'approfondir la caractérisation du cœur d'animaux mâles et femelles diabétiques afin d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques et de définir ainsi des approches thérapeutiques inédites. Trois modèles murins complémentaires ont été choisis pour leurs caractéristiques particulières : le rat Goto-Kakizaki (GK), la souris KK/Ay et le rat soumis à un régime riche en graisse et en sucre (HFHS). Chaque modèle sera composé de 12 mâles et de 12 femelles diabétiques associés à un groupe témoin non diabétique de 12 mâles et de 12 femelles. Les principales caractéristiques de ces modèles sont les suivantes : le rat GK est un modèle génétique modéré de diabète de type 2 non obèse, la souris KKAy présente un diabète de type 2 sévère avec une obésité importante et le régime riche en graisse et en sucre mime une alimentation déséquilibrée retrouvée fréquemment dans les pays développés. Dans une deuxième phase, quatre approches thérapeutiques distinctes seront envisagées sur les trois modèles murins mâles et femelles selon les résultats obtenus dans la première phase :

-Une approche anti-oxydante.

-Deux approches métaboliques.

-Une approche médicamenteuse.

Pour chaque approche, un groupe composé de 12 animaux diabétiques mâles et 12 femelles traités et de 12 animaux diabétiques mâles et femelles placebo sera utilisé. 10 animaux témoins mâles et 10 animaux témoins femelles seront ajoutés dans chaque approche thérapeutique afin de comparer l'efficacité du traitement. Pour l'ensemble du projet, le nombre maximum d'animaux diabétiques sera de 648 et le nombre maximum d'animaux témoins sera de 312.

Nous utiliserons une approche multiparamétrique in vivo et ex vivo combinant les techniques d'imagerie (IRM) et de spectrométrie (SRM) de résonance magnétique à une étude de la fonction cardiaque et à des analyses biochimiques. Notre approche expérimentale permettra de réduire de façon drastique le nombre d'animaux en accord avec la règle des 3R. L'étude in vivo permettra de réaliser un suivi longitudinal de l'animal sans sacrifice et l'étude ex vivo sera réalisée sur le modèle du cœur isolé perfusé sur le même animal. L'étude par IRM se fera sous anesthésie inhalée afin de réduire l'angoisse et la douleur. La température corporelle sera maintenue à 37°C pendant l'examen à l'aide d'une couverture chauffante. Pour l'étude ex vivo, le prélèvement du cœur se fera sous anesthésie générale profonde sans reprise de conscience. L'impact environnemental sera pris en compte par une phase d'acclimatation des animaux de quelques jours. Le bien-être des animaux sera assuré par un hébergement en portoir ventilé par cage de 3 individus avec un enrichissement composé de matériel pour nicher et se cacher ainsi que des buches et des rondins pour ronger afin de satisfaire les besoins physiologiques des animaux. Les conditions de température, lumière et humidité des cages seront contrôlées. L'eau et la nourriture seront mises à disposition en qualité et quantité satisfaisantes. Un animalier ou un chercheur contrôlera le bien-être des animaux tous les jours. Le comportement des animaux sera étroitement surveillé et une grille d'évaluation de la douleur sera remplie et le point limite déterminé en fonction des principes de Morton et Griffiths.

Les résultats obtenus dans cette étude permettront de caractériser le cœur pathologique, d'identifier de nouveaux marqueurs biologiques et de développer des approches thérapeutiques innovantes afin de réduire les complications cardiovasculaires associées au diabète de type 2 et à l'obésité.

8113 Ce projet concerne l'évaluation de l'efficacité de vaccin(s) destiné(s) à protéger une espèce de carnivore domestique contre une maladie pouvant être mortelle chez cette espèce.

Il comporte une procédure expérimentale répétitive de gravité sévère de mise au point d'un outil permettant l'évaluation de l'efficacité des vaccins.

Ce projet est conçu en accord avec les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement (3R), avec notamment :

- un caractère de stricte nécessité. Cette procédure ne peut pas être remplacée, pour le moment, par des méthodes alternatives car elle répond à l'obligation réglementaire d'être conduite sur l'espèce de destination et à l'âge minimum préconisé

- un nombre d'animaux réduit à son minimum et déterminé dans le but d'obtenir des données valides tout en respectant les exigences réglementaires.

Au total, sur 5 ans, un nombre maximum de 318 carnivores domestiques sera impliqué dans ce projet

- un hébergement des animaux en groupe avec présence d'enrichissement de manière à limiter le stress ;

- un recours à l'anesthésie générale, si nécessaire, pour garantir le bien-être animal

- des suivis cliniques fréquents et réguliers des animaux réalisés tout au long des procédures ;

- des points limites adaptés et précisément définis seront appliqués afin d'éviter toute souffrance des animaux.

8114 La médecine régénératrice s'oriente aujourd'hui vers le développement de techniques chirurgicales mini-invasives dans le but de réduire la morbidité et la durée d'hospitalisation. Pour ceci, l'utilisation d'hydrogels injectables, pouvant acquérir la forme désirée une fois implantés et présenter des propriétés mécaniques en relation avec le tissu ciblé, est particulièrement intéressante. Ces matrices injectables se forment après injection par réticulation physique, ionique ou covalente et forment ainsi de véritables réseaux macromoléculaires en 3D comparables à la matrice extracellulaire (MEC). Notre

domaine actuel de recherche est le développement d'hydrogels, pouvant être utilisés en tant que biomatériaux de substitution (hydrogel seul) ou en association avec des cellules autologues (différenciées ou non), pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse et cartilagineuse.

Afin d'améliorer les propriétés intrinsèques de ces constructions tridimensionnelles, des renforts peuvent être utilisés. Il s'agit généralement de nano ou des microparticules mais également de mélanges d'hydrogels de natures différentes. Ces constructions complexes hybrides nous permettront d'étudier et de comprendre le rôle de différents paramètres de cette MEC synthétique sur le comportement cellulaire en modélisant leur environnement tridimensionnel.

Notre objectif global est de construire des matrices extracellulaires synthétiques modulaires avec des objets fonctionnels compatibles afin d'optimiser les processus de régénération tissulaire. Il s'agit de comprendre comment la structure du gel (taille des pores, hétérogénéité, propriétés dynamiques, fonctions spécifiques...) influence la réponse tissulaire. En particulier, l'objectif premier de cette étude est d'évaluer la biocompatibilité, la stabilité en zone sous-cutanée, l'inflammation et la cinétique de dégradation de nouveaux hydrogels auto réticulant et de mélanges.

Ces essais de biocompatibilité, dégradation et inflammation seront réalisés en sous cutanée chez la souris C57BL/6.

Afin de respecter la règle des 3R "Réduire, Raffiner, Remplacer", nous mettrons en place les éléments suivants :

-Réduire : 4 implantations seront réalisées par animal, ce qui limite donc le nombre nécessaire de souris pour ces expérimentations. La réalisation de ces 4 implantations a montré une très bonne tolérance dans les expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. De plus, un seul contrôle négatif, l'HPMC-Si, sera utilisé pour l'ensemble de l'expérience. Il s'agit d'une expérimentation originale qui n'a pas de similarités avec des expériences antérieures. Par ailleurs, plusieurs types d'analyses (analyses biomécanique et immunohistochimique) seront réalisés sur un même échantillon ce qui diminuera aussi le nombre d'animaux nécessaires à l'étude.

-Raffiner : Pour cette étude, nous avons choisi d'injecter à l'aide d'une aiguille nos différentes formulations, ce qui réduit l'inflammation sur le site d'implantation, car c'est un acte minimal invasif. Ces formulations ont également été testées in vitro, et n'ont pas démontré de cytotoxicité. Ce qui devrait également limiter la réaction inflammatoire et donc la douleur. Les souris seront observées quotidiennement par du personnel de l'animalerie. Si toutefois un signe de mal-être ou de douleur est observé, les animaux recevront une dose d'analgésique (buprénorphine). En cas de douleur non contrôlée, l'animal sera euthanasié pour des raisons éthiques.

De plus, ces injections sous-cutanées seront réalisées sous anesthésie générale au masque (isoflurane).

Les points limites ainsi que la méthode d'euthanasie utilisée sont définis dans la partie procédure expérimentale (4) et sont conformes aux règles d'éthiques animales actuelles.

-Remplacer : Des études préliminaires in vitro ont été réalisées pour simuler une dégradation enzymatique par de la hyaluronidase. Ces études ont permis de sélectionner un nombre limité de formulations pertinentes pour nos objectifs de contrôle de la dégradabilité.

Cette étude se déroulera sur 1 an au maximum. 60 souris seront au maximum nécessaires. Le remplacement de l'animal pour cette expérimentation in vivo n'est pas réalisable car les processus inflammatoires sont complexes et font appel à un ensemble de cellules non modélisables in vitro.

8115 La maladie CADASIL est une forme héréditaire de maladie des petits vaisseaux cérébraux. Elle se manifeste cliniquement vers l'âge de 45 ans par des accidents vasculaires cérébraux à répétition et des troubles cognitifs, elle conduit à un état grabataire, une démence et le décès prématuré du patient vers l'âge de 60-65 ans car il n'existe aucun traitement préventif ni curatif. CADASIL est causée par des mutations très stéréotypées dans le gène Notch3 conduisant à l'accumulation anormale du domaine extracellulaire de la protéine Notch3 (Notch3ECD) dans la paroi des vaisseaux. Des travaux récents indiquent que cette accumulation anormale de Notch3ECD est à l'origine de la cascade d'évènements délétères qui conduisent aux lésions des vaisseaux puis du cerveau. Il est important de noter que la maladie évolue sur plusieurs années avant de se manifester cliniquement avec

notamment cette accumulation vasculaire anormale de Notch3ECD et des anomalies de la réactivité cérébrovasculaire, suggérant l'existence d'une fenêtre thérapeutique.

La complexité des interactions "vaisseaux –cerveau–débit sanguin" fait qu'on ne sait pas modéliser la maladie CADASIL in vitro. En revanche, nous disposons d'un modèle de souris transgéniques qui récapitulent cette phase pré-symptomatique de la maladie CADASIL, avec en particulier l'accumulation anormale de la protéine Notch3ECD et la dysfonction des vaisseaux cérébraux. Dans une étude preuve de concept avec ce modèle souris, nous avons récemment montré qu'un anticorps dirigé contre la protéine Notch3, injecté par voie intrapéritonéale plusieurs semaines à un âge où il n'existait pas encore de dysfonction vasculaire, était capable de prévenir l'apparition de cette dysfonction.

L'objectif de cette étude est de tester le potentiel thérapeutique de cet anticorps anti-Notch3 lorsqu'il est administré lorsque la dysfonction des vaisseaux cérébraux est présente. En effet, il est très important de déterminer la fenêtre thérapeutique de cet anticorps avant d'initier des essais cliniques chez l'homme. Le processus évoluant avec l'âge, les animaux seront traités durant plusieurs mois.

Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans et nécessitera au total 45 souris. L'ensemble de ce projet a été élaboré en prenant en considération les exigences éthiques de réduction, raffinement et remplacement des procédures sur l'animal. En effet, les injections intrapéritonéales seront effectuées par un expérimentateur chevronné avec des solutions d'anticorps (d'intérêt ou contrôle) diluées dans un tampon salin non irritant, en alternant le site d'injection, et les animaux seront régulièrement surveillés. La dysfonction des vaisseaux cérébraux sera réalisée ex vivo, et non in vivo, sur des artères cérébrales prélevées après la mise à mort de l'animal. L'accumulation de Notch3ECD (domaine extracellulaire de Notch3) sera quantifiée sur les mêmes animaux. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire (15 souris par groupe) pour réaliser les tests statistiques.

La réalisation de ce projet devrait contribuer à la définition de la fenêtre thérapeutique de l'anticorps anti-Notch3 dans la maladie CADASIL. Cette étude débouchera dans un moyen terme sur un essai clinique chez l'homme.

8116 La transplantation d'îlots pancréatiques est une alternative thérapeutique à l'insulinothérapie dans le traitement du diabète de type 1 (DT1). Cette approche a montré sa faisabilité et son efficacité avec l'obtention de près de 100% d'insulino-indépendance immédiatement après greffe. Néanmoins, une perte importante des cellules greffées est à l'origine de la nécessité de greffer plusieurs fois le même patient avec des cellules provenant de différents donneurs, ce qui dans un contexte de pénurie d'organe, rend difficile la généralisation de cette thérapie. En effet, les îlots provenant de donneurs en mort encéphalique et les délais d'acheminement et de temps d'ischémie pouvant aller jusque 12h, des altérations du tissu se produisent malgré l'utilisation de solution de préservations actuellement utilisées en clinique. Les dommages subis par le pancréas provoquent une perte importante de la masse d'îlots pancréatiques. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs pancréas pour obtenir suffisamment d'îlots pour reverser le diabète du receveur. Afin de diminuer la perte du greffon et de maintenir sa fonction à plus long terme, notre étude a pour but de tester de nouvelles molécules pour la préservation des organes et des îlots en culture. Pour se faire, les îlots seront cultivés en présence de solutions oxygénantes, d'anti-inflammatoires et d'antioxydants, les pancréas seront préparés dans le but de préserver au mieux les îlots. A la suite de la culture, les îlots pancréatiques seront transplantés chez le Rat diabétique afin d'évaluer l'efficacité des traitements in vivo. Nous avons choisi le rat, qui a l'avantage d'avoir des caractéristiques physiologiques proches de l'Homme et de bien supporter les interventions chirurgicales. Pour chaque groupe expérimental 10 rats diabétiques seront utilisés afin d'obtenir suffisamment de données pour réaliser des analyses statistiques. Au total, 150 rats diabétiques seront utilisés pour la transplantation et 500 rats sains pour la récupération des îlots à greffer, portant le nombre total d'animaux nécessaires à 650. Réduction : Nous utiliserons le nombre de rats minimum, mais nécessaire pour obtenir des résultats statistiques (650 rats mâles). Raffinement : Le respect du principe de raffinement intervient en premier lieu au niveau des conditions d'hébergement : les animaux auront accès ad libitum à l'eau et à la nourriture, bénéficieront de conditions de température et d'hygrométrie régulées et conformes aux règles en vigueur, ainsi que de cages enrichies à l'aide de cylindres en PVC rouges. Nous appliquerons également le principe de raffinement au niveau des méthodes de pré-anesthésie, d'anesthésie et de prise en charge post-

opératoire. Remplacement : Le principe de remplacement a été respecté car un premier screening des molécules a été réalisé in vitro montrant leur non toxicité et des effets bénéfiques. Ces derniers ne peuvent être définitivement validés qu'in vivo. Le principe de réduction a été appliqué en optimisant les isollements d'îlots permettant de sacrifier moins d'animaux pour le même nombre d'îlots.

8117 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 d'un couple chimiokine/ récepteur. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre l'un des couples chimiokine/ récepteur. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêt à des souris modifiées génétiquement pour exprimer des anticorps humanisés (insertion dans le génome des souris de gènes d'immunoglobulines humaines, afin de produire des immunoglobulines humaines à usage diagnostic et thérapeutique).

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'AcM (spécifique d'un déterminant antigénique/épitope) synthétisé par son lymphocyte parental. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petites tailles et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x 10).

La période minimum d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le 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.

8118 Les Vascularites Associées aux ANCA ("Anti-Neutrophil Cytoplasm Antibodies") (VAA) sont des pathologies auto-immunes sévères caractérisées par une destruction inflammatoire des vaisseaux de petit calibre dans différents organes, en particulier les reins et les poumons. Celle-ci est liée à l'activation des neutrophiles par des ANCA, des auto-anticorps dirigés contre les protéines exprimées sur les granules intracytoplasmiques des neutrophiles au repos : la protéinase 3 (PR3) et la myéloperoxydase (MPO). Cependant, à ce jour, les mécanismes physiopathologiques précis par lesquels les neutrophiles portent atteinte à l'endothélium microvasculaire au cours des VAA restent mal compris. Il n'existe pas de traitement spécifique pour les VAA, et la prise en charge des patients repose sur l'utilisation de fortes doses de stéroïdes et d'immunosuppresseurs aux effets secondaires délétères graves, et qui restent partiellement inefficaces. C'est pourquoi l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques plus spécifiques constitue actuellement un enjeu clinique majeur pour améliorer la prise en charge et le devenir clinique des patients VAA.

Dans des travaux *in vitro* à l'aide d'un modèle cellulaire de VAA, nous avons identifié deux miARN qui sont activement relargués au sein de vésicules extracellulaires par les neutrophiles activés par les ANCA, et qui peuvent ainsi cibler les cellules endothéliales microvasculaires (CE) et y induire des lésions sévères, en particulier en conditions inflammatoires (TNF α). Ceci suggère un rôle de ces deux miARN dans l'atteinte endothéliale causée par les neutrophiles au cours des VAA. Des stratégies thérapeutiques ciblant ces deux miARN pourraient donc avoir des implications cliniques prometteuses.

La validation des données obtenues *in vitro*, leur relevance clinique, et l'efficacité potentielle d'un ciblage thérapeutique des miARN identifiés, nécessitent l'utilisation d'un modèle de VAA plus complexe, intégrant les différents paramètres immunologiques et physiopathologiques exclus de notre modèle *in vitro* simplifié. Il n'existe qu'un modèle murin de VAA disponible, qui consiste en l'injection d'anticorps murins anti-MPO à des souris normales. Cependant, ce modèle ne fonctionne pas avec les ANCA anti-PR3, probablement parce que la PR3 n'est pas exprimée en surface des neutrophiles pré-activés chez la souris, contrairement à l'Homme. Le seul modèle de VAA à anti-PR3 rapporté à ce jour a été publié en 2012 chez la souris NSG humanisée, et consiste à injecter des IgG purifiées à partir du plasma de patients atteints de VAA à anti-PR3 à des souris NSG humanisées, c'est-à-dire sans système immunitaire naturel, qui a été reconstitué par des cellules humaines. Six jours après l'injection des IgG, ces souris développent une atteinte pulmonaire et rénale modérée similaire aux lésions observées chez les malades. Ce modèle est cependant imparfait (atteinte rénale très modérée), du fait de la faible reconstitution en cellules myéloïdes, et en particulier en neutrophiles, chez la NSG humanisée. C'est pourquoi nous proposons d'établir un modèle « amélioré » de VAA chez la souris humanisée par l'utilisation de souris NSG-SGM3, chez lesquelles la reconstitution en cellules myéloïdes est bien supérieure.

Le nombre maximum d'animaux utilisés sera de 324 souris, afin de combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le projet se développe selon 3 phases, et les étapes #2 et #3 ne seront réalisées que si les étapes qui les ont précédé ont donné des résultats positifs. Les animaux seront suivis quotidiennement et la gestion de la douleur sera maîtrisée le plus rapidement et efficacement possible. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux seront maintenus en cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

8119 Le projet se place dans un contexte clinique de traitement de tumeurs cérébrales très agressives (glioblastomes) qui selon leur localisation peuvent être non opérables. La radiothérapie conventionnelle est actuellement un traitement de référence dans de nombreux cancers. Dans le cas des glioblastomes, la combinaison de la radiothérapie, la chimiothérapie et la chirurgie ne présente qu'une efficacité limitée du fait d'un taux de récurrences très élevé et le taux de survie très faible.

Ce projet préliminaire exploratoire se place dans un contexte de développement de nano-objets qui peuvent réduire la toxicité de la radiothérapie et augmenter son efficacité en la combinant avec la

thérapie photodynamique (PDT). La thérapie photodynamique est un traitement qui utilise des médicaments non toxiques à l'obscurité (appelés agents photosensibilisants ou photosensibilisateurs) en combinaison avec la lumière et l'oxygène pour tuer les cellules cancéreuses. La finalité de ce projet est de proposer une nouvelle modalité de traitement associant deux thérapies (thérapie bimodale) en couplant les rayons à haute énergie (Rayons X utilisés dans le cas de la radiothérapie ou rayons gamma) à la PDT : la radio-PDT. Il s'agit d'une prise en charge nouvelle et non chirurgicale par rayonnement.

Le concept général relève d'un nano-objet composée de deux principes actifs activables par transfert d'énergie :

- agent scintillateur aux propriétés radiosensibilisantes et/ou de contraste pour l'imagerie
- agent photosensibilisant

Ce projet d'étude préliminaire exploratoire ex vivo (expériences réalisées sur les tumeurs prélevées après mise à mort des souris) comprend la validation de l'association des deux thérapies (transfert d'énergie) et la caractérisation photophysique du nano-objet. Ce projet fera suite à l'étude in vitro sur une lignée cellulaire de glioblastome adulte connue pour être radio-résistante. Nous souhaitons obtenir des résultats préalables ex vivo sur tumeurs ectopiques de glioblastome greffées chez la souris nude (tumeurs cérébrales d'origine humaine greffées en sous-cutanée chez la souris) avant de débiter le protocole approfondi de recherche. Le but de ce projet est de valider le concept de radio-PDT par mesure de fluorescence du nano-objet sous irradiation (rayons X ou gamma) ex-vivo.

Pour cela, une seule procédure sera nécessaire : "Xénogreffe ectopique sous-cutanée de cellules de glioblastome". Les tumeurs formées, après injection sous-cutanée de cellules tumorales chez la souris nude, seront prélevées afin de réaliser les expériences ex-vivo. Les souris seront mises à mort juste avant le prélèvement des tumeurs (volume des tumeurs : 250 à 300 mm³, soit 18 à 22 jours après l'injection des cellules tumorales).

Cette étude préliminaire exploratoire nécessitera 24 souris nude. L'étude est réalisée dans le but de respecter la règle des trois R. Afin de contribuer au REMPLACEMENT nous essayons de développer des méthodes alternatives par l'étude in vitro. Mais du fait de notre thème de recherche, la cancérologie, nous sommes contraints de développer des modèles animaux permettant de se mettre dans des conditions environnementales tumorales le plus proche possible de celles rencontrées chez l'être humain. Cette étude préliminaire menée ex vivo permettra la poursuite ou non du projet in vivo : REDUCTION. Enfin, en conformité avec le RAFFINEMENT le bien-être des animaux sera évalué par un suivi quotidien (poids et comportement général des souris). Les souris seront anesthésiées pour toutes procédures stressantes et/ou douloureuses. La mise à mort sera effectuée dès lors que l'un des points limites sera atteint (perte de poids de plus de 20% par rapport au poids avant greffe s'étalant sur plus de trois jours ou état général et comportement affectés).

8120 Les patients, atteints de cancers localisés au niveau du thorax, traités par radiothérapie thoracique peuvent développer des séquelles pulmonaires liées à l'irradiation de tissus pulmonaires non tumoraux. Les nouveaux appareils de radiothérapie permettent aujourd'hui de conformer de manière très précise les rayonnements au volume de la tumeur, avec une très grande précision dans le cas de l'irradiation en conditions stéréotaxiques, caractérisée par une imagerie de haute qualité de la tumeur, et la convergence de mini-faisceaux en son centre (faisceaux de quelques millimètres), réduisant ainsi drastiquement le volume irradié.

Ces progrès techniques autorisent des modifications des protocoles, en particulier des augmentations progressives de doses et l'utilisation de doses par fraction très élevées par rapport aux protocoles standards. Le but du projet est de modéliser chez la souris ce type d'irradiation stéréotaxique pulmonaire et de suivre l'impact de la dose, du volume irradié et du protocole de fractionnement sur le développement des lésions pulmonaires.

La lésion tissulaire sera réalisée grâce à une irradiation stéréotaxique pulmonaire chez la souris, avec un irradiateur disponible sur le site piloté par une physicienne. Le recul bibliographique sur ces modèles d'irradiation est succinct, en particulier en ce qui concerne le fractionnement de la dose. Nous utilisons ce modèle d'irradiation stéréotaxique depuis maintenant 2 ans au laboratoire.

L'espèce choisie est la souris, modèle de référence pour les études précliniques.

Pour l'ensemble du projet, le nombre estimé d'animaux est de 512.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables. Dans le but d'évaluer les effets des modifications des paramètres des protocoles de radiothérapie, nous sommes dans l'obligation d'utiliser des modèles précliniques in vivo. Les études histologiques et moléculaires se feront sur les prélèvements réalisés sur l'animal anesthésié avant euthanasie.

8121 On sait aujourd'hui qu'il existe différentes formes de mémoire. Il est ainsi commun d'opposer deux formes de mémoires : la mémoire à long terme (altérée par l'oubli d'information) et la mémoire à court terme (nécessitant celui-ci). Ce type de mémoire, permettant le stockage d'information sur une courte durée et indispensable à notre vie quotidienne (elle nous permet de nous remémorer une place de parking ou un numéro de téléphone le temps de le noter sur un bout de papier), est particulièrement sensible aux interférences, informations préalablement stockées mais non-indispensables qu'il est nécessaire d'effacer une fois une tâche accomplie. Cet « effacement » des souvenirs en mémoire à court terme permet d'éviter une saturation du système et une surcharge d'informations en mémoire à long terme.

Un grand nombre de travaux se sont récemment intéressés aux mécanismes de la mémoire dans le cerveau, mais peu se sont attachés à identifier les mécanismes responsables des processus d'oubli nécessaires à la mémoire à court terme. La synthèse protéique est nécessaire à la consolidation de nouveaux souvenirs. Les inhibiteurs de la synthèse des protéines produisent donc des déficiences prononcées dans certaines tâches d'apprentissage de mémoire à long terme. L'étude que nous proposons ici cherche à comprendre si la synthèse protéique est impliquée dans la mémoire à court terme et si son inhibition conduit bien à des déficiences de mémoire à long terme et conjointement à une amélioration du traitement (oubli) des interférences en mémoire à court terme (encore appelée mémoire de travail). Dans ce protocole expérimental, qui ne nécessite aucune chirurgie, les rats doivent accomplir une tâche d'apprentissage dans un labyrinthe radial à 8 bras pendant 3 jours. Une injection d'une dose d'anisomycine (inhibiteur de la synthèse protéique) le jour 1 ou une dose de véhicule (NaCl isotonique) chez les animaux contrôle sera effectuée en sous-cutané.

Dans le but d'avoir des résultats les plus fiables possibles, notre projet répond au maximum aux exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement :

La mémoire ne peut s'étudier que dans les conditions in vivo chez l'animal entier. L'utilisation des animaux est donc indispensable à une meilleure compréhension des mécanismes de mémoire à court terme.

2) Réduction :

Le nombre d'animaux utilisés dans ce projet est réduit à son minimum sans compromettre l'objectif du projet qui est de caractériser l'implication de la synthèse protéique au cours de plusieurs tâches d'apprentissage et de la comparer à celle de rats impliqués dans des tâches contrôle. Nous prévoyons d'utiliser 72 rats. Ce nombre d'animaux est nécessaire car nous allons étudier plusieurs apprentissages comportementaux et leur contrôle respectif. Ce nombre se justifie aussi par le fait que chaque rat ne peut pas répéter les différents apprentissages (phénomènes de sur-apprentissage biaisant les performances des animaux).

3) Raffinement :

Les études sur la mémoire nécessitent des observations sur des animaux vivants dans de bonnes conditions psychophysiologiques. Le bien-être des animaux est donc une condition sine qua non de chaque étape de l'expérimentation. Les conditions d'élevage, d'hébergement, de soins et les méthodes utilisées sont les plus appropriées pour réduire le plus possible toute douleur, souffrance, angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux. Les injections pharmacologiques sont effectuées par un personnel compétent. Chaque animal ne recevra que 2 injections de 1 ml par voie sous-cutanée (dont une seule d'anisomycine) durant toute la procédure et leur bien-être sera surveillé quotidiennement. Enfin, la privation de nourriture nécessaire à l'induction

de la motivation dans notre tâche d'apprentissage ainsi que ses conséquences sont drastiquement contrôlées. La perte de poids reste modérée (10-15%) et bien supportée par les rats.

8122 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 d'un couple chimiokine/ récepteur. Les chimiokines sont des cytokines chimio attractantes, produites par de nombreux types cellulaires dont les cellules hématopoïétiques, épithéliales et endothéliales. La fonction principale des chimiokines est le chimiotactisme, qui correspond à l'orientation des cellules au sein de l'organisme notamment au cours de la réponse immunitaire. Elles participent également à de nombreuses fonctions cellulaires comme la prolifération, la production de cytokines et la mort cellulaire. De nombreuses études scientifiques ont démontré l'implication des chimiokines en cancérologie. Elles ont notamment été décrites pour moduler l'angiogenèse, la prolifération, l'invasion, l'apoptose et l'infiltration leucocytaire au sein de la tumeur. Le développement d'outils ciblant ses acteurs constitue donc un intérêt conséquent.

Dans le cadre de cette approche, cette société a demandé à notre processus de production d'assurer la génération d'anticorps monoclonaux (AcM) contre l'un des couples chimiokine/ récepteur. La finalité de ce projet est de déterminer si le ciblage de ces protéines avec un AcM bloquant, peut s'avérer être une approche thérapeutique efficace.

L'approche envisagée consiste à injecter les protéines d'intérêt à des souris, afin d'induire une réponse immunitaire.

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'AcM (spécifique d'un déterminant antigénique/épitope) synthétisé par son lymphocyte parental. L'objectif étant de rechercher des anticorps réagissant contre une structure protéique particulière, une quantité de 20 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que possible, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps, Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (amélioration des protocoles pour éviter toute souffrance inutile).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 20 souris (2 x 10).

La durée minimale d'immunisation des souris est de 43 jours.

Dans la production d'AcM, la priorité principale est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le 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.

8123 L'agriculture est depuis toujours en constante évolution. Pour l'aider dans cette mutation la recherche agronomique a initiée de nombreux programmes de recherche, auparavant orientés vers l'augmentation des performances et l'amélioration de la productivité des espèces animales élevées et destinées à produire du lait et/ou de la viande. Aujourd'hui, elle s'orienterait plutôt à maintenir le niveau de production des animaux (ovins, bovins.) tout en prenant plus en compte les contraintes du milieu, les risques environnementaux (production des gaz à effet de serre, pollution des sols.) ou attentes sociétales (bien-être animal, qualité des produits, traçabilité de l'alimentation.). Pour répondre à une partie de ces enjeux, notre établissement utilisateur a un besoin constant d'animaux. Pour réaliser des études fines des mécanismes physiologiques d'ingestion et de la digestion des aliments chez les ruminants, les animaux modèles utilisés sont, ici des bovins laitiers. C'est un modèle animal de référence pour établir les valeurs de digestibilité et d'ingestibilité des aliments pour ruminants, et pour comprendre les processus digestifs afin de les modéliser. Pour certaines études, en particulier pour la compréhension des mécanismes de digestion et de mesure de la cinétique de dégradation des aliments, le recours à des animaux porteurs de canules est indispensable. Le projet dure 5 ans et les expérimentations conduites nécessitent de disposer chaque année de 70 vaches laitières, dont 20 porteuses de canules, ainsi que leur descendance. Ceci implique de renouveler une partie de cet effectif chaque année. Il existe des méthodes alternatives de type in vitro mais dont la précision des résultats ne permet pas toujours la généralisation. Cependant, elles sont mises en œuvre dès que possible permettant de remplacer ou de réduire au maximum le nombre d'animaux canulés utilisés et la sévérité des procédures appliquées.

La règle des 3R a été prise en compte pour l'élaboration du projet et de cette demande : i) recours à des méthodes in vitro si possible; ii) raffinement des procédures expérimentales pour réduire la douleur (antalgiques, anesthésiques, suivi post-opératoire), la souffrance et l'angoisse des animaux (habituation aux procédures, conditions d'hébergement et de contention adaptées, maintien du contact entre eux quand c'est possible, réduction du temps de présence en stalle de digestibilité, temps de repos suffisant entre les procédures appliquées et surveillance quotidienne de leur bonne santé) ; iii) schémas expérimentaux minimisant le nombre d'animaux : notamment approche en carré latin largement utilisée.

8124 La reproduction chez les ovins a lieu à l'automne et en hiver (saison sexuelle). Cette saisonnalité conduit à des variations annuelles dans la disponibilité et du prix des produits animaux (lait, viande) sur le marché. La reproduction hors saison sexuelle est un objectif prioritaire de ces filières pour pouvoir étaler la production tout au long de l'année.

Différentes techniques sont disponibles pour maîtriser la saisonnalité de la reproduction. Les traitements hormonaux d'induction et de synchronisation des chaleurs (comportement d'acceptation de la monte du mâle) et des ovulations sont les plus efficaces, étant aussi la méthode de choix pour la pratique de l'insémination artificielle (IA). L'IA, à son tour, a un rôle central pour l'organisation des schémas de sélection animale. Or, le contexte réglementaire et sociétal actuel oriente vers une moindre utilisation d'hormones en élevage.

Des méthodes alternatives aux hormones existent, notamment « l'effet mâle » qui consiste à stimuler l'activité ovulatoire des brebis en anœstrus saisonnier (au repos sexuel) par leur exposition à des béliers sexuellement actifs. La première ovulation induite par « effet mâle » a lieu avec une forte synchronie au sein d'un lot de femelles, ce qui la rend très intéressante pour la pratique de l'IA sans utilisation d'hormones. Toutefois, cette ovulation n'est pas fertile chez un nombre variable (et non prédictible) de femelles, car le corps jaune formé (structure ovarienne qui sécrète de la progestérone, hormone essentielle pour le maintien d'une gestation) régresse de façon prématuré (« cycle court »). L'objectif du projet est d'évaluer si la supplémentation de la ration avec des acides gras polyinsaturés n-3 (AGPI n-3), de par leur capacité à diminuer la production de prostaglandines inflammatoires (molécules impliquées dans la régression des corps jaunes) permettrait de prévenir ces cycles courts et les rendrait fertiles.

Un total de 240 brebis de race Ile-de-France seront utilisées. Des prélèvements sanguins seront réalisés dans la veine jugulaire (au niveau du cou) des brebis (ayant reçu ou non une supplémentation en AGPI n-3) pour i/ évaluer leur état de repos sexuel avant et la réponse hormonale des corps jaunes

formés après effet mâle, ii/ pour étudier la sécrétion de prostaglandines et iii/ pour un diagnostic de gestation précoce lors d'un test de fertilité à l'IA.

Remplacement : la stimulation de l'activité sexuelle de la brebis par effet mâle est un phénomène naturel mais complexe impliquant plusieurs organes (système olfactif, système nerveux central, hypophyse, ovaires), ne pouvant pas être étudié in vitro.

Réduction : un calcul de puissance statistique a été fait pour réduire au maximum le nombre d'animaux.

Raffinement : pour les prélèvements sanguins, des précautions seront prises afin d'éviter tout risque de phlébite (tonte au niveau du cou pour mieux visualiser les veines, application d'un baume décongestionnant, antiseptique et cicatrisant). Les brebis seront logées en bâtiment conventionnel. Les animaux seront toujours en groupe (pour éviter le stress de l'isolement), sur litière paillée, et surveillés quotidiennement.

8125 L'infarctus du myocarde reste l'une des causes principales de décès chaque année. L'étude de son fonctionnement mais surtout des mécanismes pouvant aboutir à la protection du tissu cardiaque, est donc une priorité afin d'obtenir des thérapeutiques efficaces pour réduire la taille de l'infarctus et donc ses répercussions. Notre unité travaille depuis de nombreuses années sur la compréhension des mécanismes visant à limiter la taille de l'infarctus. Nous étudions ainsi tous les phénomènes de cardioprotection tels que le pré- et le post-conditionnement, dont la compréhension permettrait l'utilisation d'outils pharmacologiques mimant ces phénomènes.

Dans cette optique, nous avons développé un modèle murin d'ischémie-reperfusion cardiaque (mimant un infarctus du myocarde) qui nous permet de réaliser des études sur la taille de l'infarctus, ainsi que des études fonctionnelles, biochimiques et moléculaires sur cette pathologie.

Dans ce projet de recherche fondamentale, il est question de mesurer la cinétique des modifications physiologiques ayant lieu dans le tissu cardiaque, tout au long d'un épisode d'ischémie-reperfusion cardiaque sur modèle murin (souris C57bl/6J). L'analyse informatique de l'ensemble des données ainsi obtenues doit permettre d'établir un « modèle dynamique des réseaux fonctionnels » prenant place durant l'ischémie-reperfusion. A terme, les objectifs de ce projet sont donc 1) d'associer ces modifications cinétiques aux mécanismes déjà mis en évidence dans la littérature, favorisant ainsi la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie et 2) de pouvoir déterminer, de manière prédictive, le moment optimum d'administration d'un traitement potentiellement cardioprotecteur (diminuant la taille d'infarctus) lors d'études précliniques (en fonction de ses cibles et de ses mécanismes d'action), diminuant ainsi le nombre d'animaux utilisés pour ces études (raffinement).

Compte tenu de la complexité des techniques et des délais d'analyses, l'étude devrait s'étaler sur 2 ans.

La ligature de l'artère principale du cœur (coronaire), nécessaire au modèle, implique une chirurgie lourde, sous anesthésie générale. Néanmoins, cet acte chirurgical est parfaitement maîtrisé au laboratoire et fait l'objet d'une analgésie et d'un suivi post-opératoire adaptés.

Dans le domaine de la recherche sur l'infarctus du myocarde, il s'agit du modèle de référence pour les études in vivo, notamment précliniques.

Notre étude ne peut pas être remplacée par d'autres méthodes expérimentales n'impliquant pas l'utilisation d'animaux vivants puisqu'elle vise à déterminer les modifications physiologiques en réponse à une séquence d'ischémie-reperfusion cardiaque. D'autre part, le modèle de cellule cardiaque n'ont aucune fonction contractile et présentent un phénotype différencié. Seule une étude sur l'animal permettra donc d'apporter une réponse pertinente.

Un test de puissance a été réalisé pour déterminer le nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats analysables statistiquement pour cette étude (réduction). Ainsi, l'effectif ajusté au « minimum nécessaire » est de 174 souris C57bl/6J âgées de 8 à 14 semaines au moment de l'expérimentation, réparti sur les 2 années d'expérimentation.

Pour garantir le bien-être des animaux dès leur arrivée, un enrichissement du milieu est immédiatement mis en place, renouvelé très régulièrement jusqu'à l'expérimentation et remis à disposition de l'animal en soin post-opératoire (raffinement). Pour supprimer la douleur et souffrance

de l'acte chirurgical, celui-ci est réalisé sous anesthésie générale avec prémédication analgésique et anesthésique local. Pour limiter au maximum la douleur et la souffrance potentielles de l'animal en post-opératoire, eau et nourriture sous forme gélifiées seront mises à disposition en plus de la nourriture et boisson habituelles, les groupes sociaux seront conservés et un protocole analgésique continu sera mis en place. De plus, après la chirurgie, le comportement et l'état de l'animal seront suivis (fiche d'évaluation spécifique à la chirurgie envisagée) afin d'adapter les soins et le protocole analgésique, ou déclencher l'arrêt du protocole (raffinement).

Le prélèvement (puis conservation) d'autres tissus que le cœur est envisagé en concertation avec l'ensemble du laboratoire au moment de la réalisation du projet afin d'optimiser et de valoriser au mieux les prélèvements (réduction).

- 8126** L'exposition des populations aux iodes radioactifs rejetés lors d'accidents de réacteur d'une centrale nucléaire peut être responsable en l'absence de mesures de protection adaptées de l'apparition de cancers de la thyroïde, en particulier chez les nourrissons et les jeunes enfants. Les conséquences sanitaires peuvent néanmoins être limitées par la mise en œuvre de mesures de protection, telles que la mise à l'abri des populations, leur évacuation, la mise en place de restrictions de consommation alimentaire et enfin, l'ingestion de comprimés d'iode stable.

Le présent projet de recherche propose de déterminer les modalités d'administrations répétées d'iode stable en situation de rejets radioactifs chroniques, de faire évoluer l'actuelle autorisation de mise sur le marché des comprimés d'iodure de potassium dosés à 65 mg, et enfin d'évaluer les effets indésirables d'administrations répétées d'iode stable sur les grandes fonctions physiologiques de l'organisme. Les expérimentations seront réalisées sur le rat wistar qui constitue un des modèles de référence pour les études de pharmacologie et de toxicologie de l'iode. Ce projet, articulé autour d'un protocole nécessite un nombre maximal de 58 animaux. De l'iode stable sera administrée à de jeunes rats (après sevrage) une fois par jour pendant 8 jours consécutifs afin de déterminer les effets de cette prise sur le long terme. Les animaux seront mis à mort 30 jours après le gavage sous anesthésie générale.

Les résultats issus des travaux mis en œuvre dans le cadre de ce projet permettront à termes de proposer aux autorités sanitaires de nouvelles solutions opérationnelles pour la prévention des expositions aux iodes radioactifs et bénéficieront ainsi à l'évolution de la « doctrine iode ». De plus, les nouvelles recommandations françaises issues de ces travaux scientifiques innovants pourront faire évoluer les « doctrines iode » au niveau international avec pour bénéfice une harmonisation des pratiques en la matière.

Cette étude prend en compte la règle des 3 R :

Remplacement : il n'existe à l'heure actuelle aucune méthode de substitution in vitro pour étudier l'impact de l'iode stable sur le métabolisme général d'un individu. La rat wistar constitue un des modèles de référence pour les études de pharmacologie et de toxicologie de l'iode car il présente des mécanismes physiologiques proches de ceux qui sont observables chez l'homme.

Réduction : le nombre d'animaux est le minimum nécessaire pour mettre en évidence des différences statistiquement significatives entre les groupes.

Raffinement : la méthode utilisée (gavage) est peu invasive, rapide à effectuer et n'induit aucune douleur. Les animaux seront hébergés dans des cages contenant un tunnel ainsi que des bâtons de bois afin qu'ils puissent ronger, ce qui est un comportement caractéristique de leur espèce.

- 8127** Les infections hospitalières sont un problème majeur qui concerne le monde entier. En Europe, 8 à 12% des patients hospitalisés subissent des événements indésirables lors de leur prise en charge et en particulier des infections nosocomiales. D'après le Centre Européen de Prévention et de Contrôle des Maladies, plus de 4 millions de patients européens développent des infections nosocomiales conduisant à 37000 décès chaque année. En outre, de nombreuses bactéries pathogènes pour l'Homme sont désormais résistantes à la plupart des antibiotiques utilisés en clinique. Les problèmes de traitement et de contrôle des maladies infectieuses représentent un danger pour la santé publique à l'échelle mondiale. Par conséquent, il est urgent de développer de nouveaux composés pour contrôler les populations de bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques.

Parmi ces bactéries pathogènes, les *Staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline (SARM) sont une cause majeure d'infections hospitalières. En 2008, plus de 380000 infections nosocomiales dues à des bactéries multirésistantes ont été dénombrées en Europe. Les SARM étaient responsables de 44% de ces infections, conduisant à 22% des décès. Le coût des infections à SARM est estimé à 380 millions d'euros par an. Les SARM sont également une source croissante d'infections communautaires, d'infections du bétail et d'infections chez les personnes exposées au bétail infecté. Le développement des SARM est donc un problème de santé publique majeur à fort impact économique et difficile à contrôler. Par conséquent, la découverte de nouveaux antibiotiques pouvant contrôler la croissance des SARM est donc une priorité.

Depuis une quinzaine d'années, seulement deux composés de structure nouvelle ont été découverts par des méthodes de criblage empiriques et ont été introduits en clinique : la daptomycine et le linézolide. De nouvelles approches sont nécessaires pour viser des cibles thérapeutiques originales contre lesquelles aucun composé n'a été développé. Dans ce contexte, nous avons synthétisé une série d'inhibiteurs puissants d'une enzyme originale qui est essentielle à la survie bactérienne. Les meilleurs composés possèdent une activité bactéricide *in vitro* contre *S. aureus* à des concentrations comparables à celles des antibiotiques utilisés actuellement en clinique.

Notre objectif à ce stade est de démontrer l'activité antibactérienne de nos composés *in vivo* dans un modèle murin d'infection staphylococcique. Comme l'homme, la souris peut être naturellement colonisée par *S. aureus*. Les deux espèces peuvent également développer des pathologies similaires comme l'arthrite et le sepsis. La souris est donc l'espèce la plus utilisée pour l'étude de l'infection par *S. aureus*. Elle est également très utilisée pour le développement de nouvelles approches thérapeutiques curatives ou préventives. Notre choix se portera plus précisément sur un modèle murin de pyélonéphrite à *S. aureus* qui mime une autre des manifestations cliniques de l'infection chez l'homme. Ce modèle permet de réduire l'inconfort des animaux (pas de douleur chronique) ainsi que de diminuer les effectifs (grande reproductibilité). Nous utilisons en priorité des méthodes substitutives afin de cribler nos composés et d'étudier leur efficacité et leur toxicité *in vitro*. Cependant, le développement d'une nouvelle molécule thérapeutique nécessite un modèle animal mimant la pathologie humaine.

Les infections seront réalisées sur des souris BALB/c femelles de 8 semaines et de poids similaires qui auront été acclimatées à leur nouvel environnement pendant une semaine. Le projet utilisera deux souches cliniques de *S. aureus*, l'une sensible à la pénicilline l'autre résistante et comportera trois procédures. L'étude toxicologique (procédure 1), l'établissement de l'inoculum bactérien optimal injecté, la caractérisation de l'effet dose/réponse du composé (procédure 2, sévérité modérée) et le suivi de l'infection par bioluminescence (procédure 3, sévérité modérée) nécessiteront un total de 396 souris. Les dommages attendus sont limités aux souris infectées du groupe contrôle traité avec un placebo qui développeront une pyélonéphrite.

Afin de respecter la règle des 3R, des études préliminaires ont été réalisées *in vitro* afin de sélectionner les meilleurs composés. Le nombre de souris utilisées sera réduit au strict minimum et toutes les procédures comporteront des mesures pour limiter la souffrance et l'anxiété des animaux. L'étude toxicologique (procédure 1) sera réalisée sur un nombre limité de souris non infectées (18 souris), ce qui permettra de stopper le projet en cas de toxicité aiguë du composé. Le suivi de l'infection par imagerie non invasive permettra également de réduire le nombre de souris nécessaire à l'étude. Les souffrances éventuelles seront liées à l'infection par *S. aureus* (pyélonéphrite). Celle-ci peut induire chez la souris des symptômes aspécifiques (prostration, immobilité, apathie, expression faciale indiquant la douleur, perte de poids supérieure à 20%). Des points limites pouvant être facilement surveillés ont été établis afin d'interrompre l'expérimentation en cas de souffrance importante des animaux. Le bien-être des souris sera pris en compte depuis la phase d'acclimatation dès laquelle un enrichissement de l'environnement sera mis en place (ajout de coton dans chaque cage pour la construction d'un nid) jusqu'à la phase expérimentale pendant laquelle une visite quotidienne sera assurée. L'état de l'animal sera évalué et s'il se détériorait jusqu'à conduire à la prostration, l'immobilité, l'apathie, le hérissément des poils, le tremblement, la cyanose, et la perte de poids supérieure à 20%, les animaux concernés seraient mis à mort de manière anticipée pour éviter d'atteindre des niveaux significatifs de souffrance et/ou de détresse.

8128 Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie liée à la destruction, par les cellules du système immunitaire, des cellules bêta des îlots de Langerhans qui produisent l'insuline, l'hormone qui permet au corps d'utiliser le glucose issu entre autre de notre alimentation. Depuis bientôt cent ans, le traitement des patients atteints de DT1 repose essentiellement sur la mise en place d'un traitement palliatif par insulinothérapie. Avec une progression alarmante de 3-4% de la maladie par an, le développement de thérapies préventives ou curatives constitue un défi sociétal majeur. Plusieurs études cliniques de phases 2 et 3 ont tenté d'induire la tolérance immunologique soit en inhibant de façon aspécifique les réponses lymphocytaires soit en ciblant la réponse immune spécifique d'un antigène bêta-cellulaire spécifique à l'aide d'une vaccination (l'acide glutamique décarboxylase (GAD65) ou l'insuline). L'ensemble de ces études a été mené chez des patients recrutés au moment du diagnostic clinique. A ce stade, la majorité des cellules bêta a déjà été détruite par des lymphocytes T auto-réactifs dont le répertoire s'est diversifié au cours de la phase asymptomatique. La plupart du temps, en effet, le diagnostic du DT1 est fait relativement tard dans l'évolution de la maladie. Néanmoins, durant un temps variable suivant les personnes, la destruction des cellules bêta n'est pas totale, mais progresse encore. Avant de disparaître complètement, ce qui s'accompagne d'une perte en qualité de vie pour le patient, la capacité de produire de l'insuline peut ainsi être partiellement maintenue. C'est durant cette période, parfois surnommée « lune de miel », qu'il est envisageable de préserver les cellules bêta pancréatiques en ralentissant la progression de la maladie par une intervention thérapeutique innovante. Les exosomes sont des petites vésicules (environ 100nm de diamètre, comparables à des virus) qui sont produites par les cellules, et qui vont permettre un transfert de molécules qui provoqueront une réaction des cellules réceptrices, y compris les cellules du système immunitaire. Ces molécules peuvent aussi bien être des protéines, telles des cytokines et les auto-antigènes, que des acides nucléiques. Les acides nucléiques dont il est question ici sont particuliers : ce sont des ARN très petits nommés micro-ARN (ou miRNA ou « miR »). Ils peuvent avoir deux types de rôle : « interférence ARN » et/ou « miRokine » (réaction-type "face au danger"). Il existe des dizaines de miRNA différents dans les exosomes de cellules bêta, et certains sont déjà identifiés, y compris par nous-même, comme de bons candidats pour moduler la réaction auto-immune.

Pour cette raison, nous souhaitons tester le pouvoir thérapeutique des exosomes de cellules bêta par injection dans les ganglions lymphatiques sous-cutanés permettant d'éliminer le problème de la biodisponibilité en délivrant le médicament directement au site de son action. La complexité d'une réaction immunitaire est pour le moment au-delà de ce que nous parvenons à reproduire artificiellement in vitro ce qui implique l'utilisation d'animaux comme les souris NOD, spontanément sujettes au DT1. Des souris ne développant pas de DT1 serviront de contrôles (NOR, NSG et C57BL/6). Trois types d'expériences seront faites : 1) prélèvements de ganglions lymphatiques sur des souris pour culture in vitro avec des exosomes produits in vitro, des miRs ou des antagonistes de miRs (antagomiRs). 2) injection intralymphatique d'exosomes, miRs ou antagomiRs dans des souris pour étude de la réaction immunitaire dans les nœuds lymphatiques injectés. 3) traitement de souris en pré-diabète par injection intralymphatique d'exosomes, miRs ou antagomiRs pour surveillance de la survenue du DT1.

Dans un souci éthique constant et intégrant la règle des trois R :

Réduire et remplacer : nous ferons un maximum d'études in vitro et ex vivo (ganglions lymphatiques). Nous réduirons le nombre d'animaux utilisés à 660, garantissant une interprétation valable et statistique des résultats. Enfin, les prélèvements issus de cette étude seront conservés et répertoriés pour permettre des analyses ultérieures afin d'éviter de reproduire une expérience déjà faite pour implémenter une mesure qui n'aurait pas été prévue.

Raffinement : des mesures de raffinement seront prises pour éviter la douleur et réduire la souffrance et l'angoisse pour les animaux. Les observations quotidiennes des animaux et leurs manipulations seront faites par des personnels formés et entraînés. Les procédures sont de classe légère sauf une de classe modérée. Dans ce cas, la prévention de la douleur impliquera une anesthésie générale par kétamine-médétomidine ou par anesthésie gazeuse à l'isoflurane ayant des actions antalgiques adaptées. Une surveillance particulière des souris sujettes à développer un DT1 sera effectuée dans le but de réduire tout inconfort et toute douleur. Tous les animaux auront libre accès à l'eau, à la nourriture durant toute la durée des expériences et disposeront d'enrichissement dans leur cage.

8129 Dans un contexte de hausse du coût des aliments, un des points clés de la rentabilité de l'élevage est l'efficacité alimentaire des animaux, c'est-à-dire leur capacité à transformer l'aliment ingéré en un produit d'intérêt tout en limitant les rejets polluants. L'efficacité alimentaire est sélectionnable chez les animaux de rente. Chez les bovins, il a été montré que les capacités digestives étaient à la fois impactées par le niveau d'efficacité alimentaire des animaux et par le niveau énergétique de la ration. Du fait d'interactions entre ces 2 effets et de faibles effectifs testés (de 30 à 80 animaux en moyenne), les conclusions entre les études publiées sont parfois contradictoires. Notre projet porte sur l'exploration de la capacité digestive des jeunes ovins en lien avec leur niveau génétique d'efficacité alimentaire et le type de ration qui leur est proposé. La capacité digestive sera appréciée par la quantification des nutriments absorbés et celle du microbiote ruminal. Deux rations seront distribuées : la première, très énergétique et riche en amidon est semblable à l'aliment fourni aux agneaux à l'engraissement et sera distribuée à l'âge de 3 mois durant 6 semaines ; la seconde, très riche en foin et moins énergétique, est proche de l'aliment fourni classiquement en phase d'entretien des brebis et sera fournie à partir de 6 mois d'âge pendant 6 semaines. Durant ces 2 phases d'alimentation, la consommation quotidienne des 80 agneaux sera enregistrée.

A l'issue de chacune de ces deux phases de mesures d'ingestion, les agneaux auront un prélèvement du contenu ruminal pour la caractérisation du microbiote du rumen, et des nutriments énergétiques produits par ce microbiote et directement utilisés par l'animal. Une prise de sang sera également faite pour estimer les nutriments absorbés par l'animal, et pour caractériser le génome de l'animal. Enfin, les fèces seront collectées puis analysées par spectrométrie dans le proche infra-rouge afin de mettre au point un modèle de prédiction de l'ingestion qui permettrait ultérieurement de prédire l'ingestion au pâturage.

Nous prévoyons d'étudier 400 agneaux de race Romane (produits sur cinq ans) appartenant à 2 lignées sélectionnées sur leur efficacité alimentaire : lignée efficace vs. lignée peu efficace.

Respect de la règle des 3R :

- Raffinement : Les animaux seront hébergés sur une aire paillée en groupe, de manière à exprimer leurs comportements sociaux. Des disques à mordiller seront suspendus dans les parcs. Afin de limiter le stress de contention, les prélèvements seront réalisés par du personnel qualifié à l'aide de matériel de contention adapté aux ovins et auquel les animaux sont habitués. Seuls 2 prélèvements seront réalisés par animal à la fin de la distribution des 2 types d'aliments, et cela à plus de 10 semaines d'intervalle. Les prélèvements de fèces, sang et de contenu ruminal se feront successivement lors de la même contention, afin de réduire au maximum le temps de contention. Les animaux font l'objet d'une surveillance toute particulière au moment des prélèvements et après ceux-ci.

- Réduire : L'efficacité alimentaire mesurée pour un animal est le résultat d'une combinaison de la valeur génétique de cet animal et des effets de l'environnement. La valeur génétique permet de mieux caractériser un animal (en s'affranchissant des effets de l'environnement sur la mesure elle-même) et permet ainsi limiter l'effectif mesuré à 200 animaux par lignée.

- Remplacer : Aucun modèle alternatif ne peut être mis en place pour étudier les effets de la sélection génétique sur la capacité digestive.

8130 Un enfant sur 100 est atteint d'autisme et à ce jour aucun traitement médical ne peut guérir tous les symptômes de ce trouble du développement du cerveau. Des centaines de gènes au sein desquels des mutations ont été identifiées sont considérés comme facteurs de risque. Certains gènes, lorsque mutés ont un impact majeur pour l'autisme. Ils codent souvent pour des protéines de la synapse, lieu de communication entre les neurones permettant la transmission des informations nerveuses. Une protéine particulière joue un rôle important dans le fonctionnement des synapses. Des mutations au sein du gène de cette protéine ont été retrouvées et pourraient à elles seules être responsables de l'autisme avec déficience intellectuelle

Analyser dans un contexte de cerveau vivant, le développement de neurones humains déficients en la protéine d'étude, importante pour le fonctionnement des neurones et de leurs synapses, représente une étape majeure pour analyser les mécanismes cellulaires déficients et trouver des pistes thérapeutiques. Cette étude devrait permettre de grandes avancées dans ce domaine. Cette étude

consiste en la reprogrammation de fibroblastes en cellules pluripotentes qui seront ensuite différenciées en neurones. Ces neurones humains issus d'individus témoins et d'individus porteurs de mutations dans ce gène synaptique seront réimplantés dans le cortex de souris nouveau-né pour étudier leur développement, les connexions qu'ils établissent, leurs synapses actives ou non. Ces souris seront immunodéficientes afin d'éviter tout rejet de greffe.

Ce projet comporte l'analyse parallèle de tissus de cerveaux de souris en post-mortem. Les souris transplantées par précurseurs de neurones humains seront étudiées sur une période de 2 à 12 mois.

L'étude complète de cellules issues de 8 individus est prévue sur 5 ans.

772 souris seront utilisées sur 5 ans.

Des mesures seront mises en place pour supprimer ou limiter les effets dommageables pour les animaux. Les opérations chirurgicales seront menées sous anesthésie générale. Elles seront suivies d'une période de surveillance biquotidienne avec recours à des antalgiques autant que nécessaire. Les animaux seront mis à mort en fin d'étude pour analyse des cerveaux ou en cours d'expérimentation s'ils montrent des signes de souffrance non soignables par des analgésiques.

Le recours à l'animal est nécessaire car l'objectif de cette étude est d'analyser le développement des cellules humaines *in vivo*, dans un environnement le plus proche possible des conditions rencontrées chez les patients, et leur intégration dans l'architecture complexe du cerveau. Le nombre d'animaux utilisé est réduit à son minimum et aucune autre modalité de remplacement n'est possible pour répondre à la question posée. Pour ce faire, nous utiliserons des statistiques adéquates nous permettant d'apporter une conclusion à l'issue de l'obtention des données expérimentales, ceci afin de réduire à son minimum le nombre d'animaux nécessaires. Bien qu'une étude comparative pourrait être intéressante, aucune analyse n'est envisagée comprenant la greffe de neurones issus de fibroblastes de souris déficientes en protéine d'intérêt, ceci afin de respecter la règle des « 3R » et de réduire le nombre d'animaux en raffinant ainsi la démarche expérimentale.

Les souris immunodéficientes seront maintenues dans un environnement protégé pour réduire le risque d'infection. Elles seront hébergées avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

Ce projet est basé sur des résultats initiaux (publiés ou en voie de publication) tant sur l'effet de mutations du gène étudié que sur la technique de réimplantation qui a déjà donné pour d'autres domaines que celui de l'autisme des données significatives. Ces résultats obtenus sans l'utilisation d'animaux permettent également de réduire à son minimum le nombre d'animaux utilisés.

8131 Les tumeurs hypophysaires humaines ont une incidence élevée (1 personne/1500). Ces tumeurs bien que bénignes provoquent des maux de tête, des troubles visuels et peuvent être invasives et agressives dans certains cas. Elles répondent très mal aux traitements thérapeutiques classiques et il est donc indispensable de trouver de nouvelles molécules pouvant limiter leur développement. Bien que ces lésions soient très fréquentes chez l'homme, nous ne disposons pas d'outils d'étude pour caractériser leur comportement, identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et tester de nouveaux traitements cliniques. Leur étude est donc tributaire de modèles précliniques qui soient représentatif et facile d'utilisation. Bien que l'accès à la tumeur reste délicat, nous disposons de prélèvements chirurgicaux qui n'ont jusqu'à présent pas permis d'établir de modèles cellulaires d'études. C'est dans ce contexte que notre projet vise à i) maintenir un modèle expérimental de greffe de tumeurs hypophysaires, ii) utiliser ce modèle pour tester des drogues qui nous sont proposées chaque année par des compagnies pharmaceutiques et iii) développer de nouveaux modèles de greffe de tumeurs de patient afin de pouvoir établir de nouveaux modèles expérimentaux plus proches du patient et de dériver des outils cellulaires qui devraient réduire nos besoins en expérimentation animale. Notre projet réalisé sur 5 ans nécessitera un maximum de 900 souris et 465 rats, afin de réaliser les greffes initiales de tumeurs hypophysaires, leur maintien et la mise en place de tests de nouvelles molécules thérapeutiques. Les animaux recevront sous anesthésie des greffons lors d'une procédure chirurgicale simple de moins de 10 minutes et maîtrisée par les expérimentateurs. Le suivi des animaux étant assuré de façon quotidienne en post-opératoire et tout au long du développement des tumeurs afin d'identifier tout signe clinique nécessitant de traiter les animaux avec des antidouleurs ou le cas échéant d'arrêter la procédure expérimentale. Notre projet tient compte de la démarche des 3R comme décrite en détail ci-dessous.

Stratégie de réduction : Pour chaque expérience, le nombre d'animaux par groupe a été réduit au maximum, sans mettre en péril la production de matériel biologique et l'obtention de conclusions statistiquement interprétables qui dans leur ensemble devraient conduire à éviter des répétitions inutiles d'expériences.

Stratégie de raffinement : Une fiche individuelle de traçabilité et de suivi sera établie pour chaque animal greffé/traité afin de les suivre attentivement, une approche de suivi en imagerie échographique non invasif sera également développé sur animal vigile pour permettre un meilleur suivi du développement des tumeurs. Cette approche permettra d'assurer un meilleur suivi des animaux et d'identifier les signes cliniques nécessitant de prévoir des traitements palliatifs ou d'arrêter les procédures expérimentales.

Stratégie de remplacement : A chaque greffe, des essais de mise en culture des tumeurs seront réalisés pour établir des lignées cellulaires afin de raffiner nos travaux et réduire l'utilisation à venir d'animaux pour nos futurs travaux. Signalons enfin que l'utilisation d'anesthésiques, une définition précise des points limites, et une surveillance adaptée des animaux permettent de limiter au maximum la souffrance animale.

8132 Depuis l'antiquité égyptienne, des essais de traitement par administration de sang à des malades sont documentés. Les transfusions de sang animal sont abandonnées au début du 19^{ème} siècle mais ce n'est qu'avec les découvertes du système des groupes ABO en 1900 que les transfusions sanguines deviennent sûres. Elles sont utilisées à grande échelle pendant la première guerre mondiale. Le facteur rhésus est découvert en 1940. En pratique, le sang complet humain n'est plus utilisé pour la médecine de l'homme en occident, il est remplacé par des concentrés érythrocytaires pour compenser les anémies, notamment liées à une hémorragie, les concentrés plaquettaires pour traiter les aplasies, essentiellement d'origine néoplasique ou iatrogènes dans le cas des chimiothérapies anticancéreuses ou du plasma, utilisé pour des patients présentant des pertes protéiques importantes (brûlés), des déficits en anticorps (maladies immunodépressives ou auto-immunes) ou des déficits en facteurs de coagulation.

Devant la complexité (et le coût) de la constitution de banques de sang, liée à la difficile conservation des produits biologiques (de quelques heures à quelques jours pour les cellules), la transfusion de sang total frais est toujours d'actualité en médecine vétérinaire après un test de compatibilité de type "groupages" ou "cross-match" pour les espèces où les tests de groupage ne sont pas disponibles. On estime que les avantages thérapeutiques de la transfusion en compensent les risques lorsque l'hématocrite du receveur est de l'ordre de 15%.

Pour pouvoir réaliser ces transfusions en pratique ou produire du plasma, nous envisageons de pouvoir réaliser des prélèvements sanguins de l'ordre de 10% du volume sanguin total une fois par quinzaine au maximum sur des animaux de différentes espèces présents dans l'établissement à d'autres fins (scientifique ou d'enseignement) car selon les modifications réglementaires introduites en 2010, le prélèvement de sang sur des animaux de propriétaires nous semble illégal bien que ce soit probablement la méthode d'approvisionnement la plus fréquemment utilisée en France.

Nos services cliniques réalisent 50 à 70 transfusions par an, toutes espèces confondues. En plus de cette utilisation thérapeutique du sang total et du plasma, il nous arrive également de fournir des équipes de recherche en sang pour les essais nécessitant par exemple une circulation extracorporelle.

Même s'il est difficile de prévoir avec précision le nombre d'animaux nécessaires, nous estimons que sur la période de 5 ans couverte par la présente demande, la procédure de prélèvement sera réalisée environ une fois par semaine. Le nombre minimal d'animaux par espèce pouvant couvrir ces besoins serait donc de 2 pour un prélèvement tous les quinze jours. A titre de précaution pour les périodes de pic de demande nous estimons qu'une présence permanente de 4 animaux des espèces chien, chat, furet, porc, mouton, bovin est le minimum nécessaire soit 24 animaux au total.

Pour les mêmes raisons que celles qui justifient le maintien de systèmes de collecte de sang chez l'Homme, le remplacement de ces animaux donneurs de sang par des systèmes inertes est impossible dans l'état actuel des connaissances. Un débat éthique ou législatif serait sans doute judicieux entre la stratégie ayant recours à des animaux donneurs très occasionnels appartenant à des personnes

privées et impactés de manière très rare par le prélèvement sanguin et la stratégie recourant à des animaux propriétés de centres de soins (ou d'un organisme externe dont l'objectif est la production sanguins) qui seraient beaucoup moins nombreux mais prélevés de manière beaucoup plus fréquente. En l'état actuel de la réglementation, il nous semble que la seconde stratégie, menant à une réduction du nombre d'animaux mais à une augmentation de la charge en termes d'inconfort pour chaque individu est la seule voie autorisée. Nos animaux ne sont évidemment pas mis à mort dans ces procédures. Pour des raisons de bien-être animal et de sécurité du personnel, différentes stratégies seront mises en place selon les espèces afin de réduire ou de compenser l'inconfort du prélèvement (tranquillisation pour les chats, les furets et les porcs vs récompense pour les chiens).

8133 Le sepsis correspond aux dysfonctions d'organes induites par la réponse dérégulée de notre organisme face à une infection. Ce concept récent d'un corps acteur de sa propre destruction représente un changement important par rapport à la vision d'un organisme passif souffrant de la destruction directement causée par un agent bactérien, viral ou fongique par exemple.

Il représente 10% des admissions de réanimation, et entre 10 et 50% des morts en réanimation.

Les dysfonctions d'organes retrouvées chez les patients en sepsis sont variées : insuffisance rénale, hépatique, respiratoire mais aussi fréquemment du système nerveux, même si ce fait est régulièrement masqué par l'utilisation d'anesthésiques en réanimation. Cette encéphalopathie septique est associée à une surmortalité (63% en cas de coma) et elle expose les survivants à un risque de démence 8 fois plus fréquent pendant les 10 premières années après leur sortie de réanimation.

Les défaillances d'organe, apparaissant très tôt au cours du sepsis peuvent donc persister plusieurs années chez les patients survivants.

Pourquoi ces organes dysfonctionnent ?

L'hypothèse proposée a longtemps été celle d'une mort cellulaire massive au sein des organes, mais, de façon surprenante, des données récentes montrent que la survie des cellules et l'architecture de tissus de patients décédés de sepsis ne sont pas altérés au point d'expliquer la défaillance.

La perte de fonction d'un tissu proviendrait donc en partie de la défaillance de cellules réussissant à survivre, plus que de la mort de ces cellules.

La nature des atteintes de ces cellules, et les raisons pour lesquels les mécanismes de réparation ne réussissent pas à venir à bout de cette « mémoire cellulaire » d'une agression passée, mêmes des années après la sortie d'hospitalisation, restent pour l'instant largement inconnues.

Notre projet concerne à la fois la recherche fondamentale et translationnelle. Il vise à améliorer la caractérisation des atteintes du système nerveux central après un sepsis, et à évaluer le potentiel d'une thérapeutique visant à pallier l'une des altérations cellulaires déjà décrites.

Les effets du sepsis sont systémiques et complexes. Une telle complexité ne peut, à l'heure actuelle, être déconstruite et reconstruite de façon réaliste in vitro. Le modèle animal est donc une nécessité afin d'améliorer notre compréhension et les traitements actuels d'une des causes majeures de mortalité dans le monde.

Dans le cadre de ce projet nous utiliserons des modèles murins transgéniques ou non, avec un total de 1866 animaux sur une période de 5 ans, afin de réaliser trois procédures expérimentales de classe modérée. Les populations seront adultes avec un âge moyen de 12 semaines, et elles comprendront à la fois des mâles et des femelles afin d'être représentatif de la population générale et de pouvoir extrapoler les résultats.

Nous mettrons en œuvre pour chaque expérimentation : 1) une analyse statistique de façon à déterminer le nombre optimal d'animaux nécessaire par groupe d'expérimentation, 2) des points limites permettant de mettre fin à l'expérimentation sur l'animal, 3) des règles d'élevage en accord avec la réglementation pour limiter la souffrance et le mal être des animaux, et 4) une valorisation de chaque animal avec un partage des prélèvements par nos différentes équipes de recherche.

8134 Dans un précédent, nous avons observé que le premier fluide issu de la glande mammaire, appelé colostrum, influence la croissance des souris et la maturation du système immunitaire digestif en début de vie. En particulier, nous avons observé que les souris allaitées dès la naissance par des mères donnant du lait mature, et non du colostrum, présentaient un défaut d'une population immunitaire de la muqueuse digestive, les innate lymphoid cells de type 2 (ILC2) qui sont impliquées dans les défenses contre les parasites intestinaux. Les objectifs de ce projet sont de (1) déterminer le rôle d'un facteur de croissance présent dans le colostrum en grande quantité, Epidermal Growth Factor (EGF), dans la croissance des souris et le développement de cette population lymphocytaire (2) déterminer l'impact fonctionnel du défaut d'ILC2 sur les défenses antiparasitaires chez les souriceaux n'ayant pas reçu de colostrum. Cet objectif est important en termes de santé publique car une étude sur une population de 100000 enfants dans des pays en voie de développement publiée en 2017 a démontré que (1) près de 50 % des nouveaux nés ne reçoivent pas le colostrum en quantité optimale (2) un excès de mortalité de près de 50 % est observé chez les nouveaux nés n'ayant pas reçu le colostrum de façon optimale. Nous formulons l'hypothèse que cet excès de mortalité pourrait être lié au défaut d'ILC2, importants pour l'élimination des parasites intestinaux endémiques dans ces régions. Par ailleurs, sur le plan fondamental, les facteurs qui gouvernent l'établissement des ILC2 dans la muqueuse digestive ne sont pas établis actuellement. Ces expériences nous permettront de démontrer par quels moyens le colostrum exerce des effets bénéfiques sur la santé et de proposer des approches nutritionnelles de prévention de la mortalité néonatale.

La réalisation de ce projet visera à respecter rigoureusement la règle des 3R et respectera des points limites adaptés. Réduction : en nous basant sur des données bibliographiques et notre expérience sur les modèles expérimentaux murins, nous avons établi que pour ce projet nous utiliserons un maximum de 104 souris pour une période de 12 mois. En utilisant les souris femelles pour l'analyse des réponses antiparasitaires et les souris mâles pour l'analyse des populations immunitaires, nous réduirons le nombre d'animaux nécessaires en utilisant à la fois les femelles et les mâles issus des portées. Raffinements : les conditions d'hébergement des souris sont optimisées pour minimiser le stress des animaux et le statut sanitaire des zones où nos animaux sont hébergés permet une très bonne reproductibilité des observations. Nous évaluerons le comportement des souris et leur signe de souffrance tout au long de notre expérimentation 3 fois par semaine. en prenant soin de ne pas déranger les mères allaitantes L'euthanasie des souriceaux a été adaptée à leur résistance à l'anesthésie gazeuse et se fait exclusivement par injection létale de barbituriques. Des mesures d'enrichissement sont prises de façon systématique, telles que l'ajout d'igloo et de coton dans les cages. Enfin, des mesures de remplacement sont d'ores et déjà établies car nous développons en parallèle une collaboration une société privée qui a établi le rôle fondamental du colostrum dans la prévention de la mortalité néonatale. Les études chez la souris restent à ce stade indispensables car elles démontreront par quel mécanisme le colostrum permet une telle protection ce qui permettra de réaliser des interventions nutritionnelles adaptées pour prévenir la mortalité infantile.

8135 Le diabète de type 1 (DT1) est une maladie provenant de la destruction auto-immune par des lymphocytes T, des cellules β pancréatiques localisées dans les îlots de Langerhans au sein du pancréas. Les cellules β sécrètent l'insuline, une hormone hypoglycémisante essentielle. La maladie se traduit donc par une carence en insuline et des hyperglycémies dont les conséquences peuvent être très graves. La prévalence de la maladie ne cesse d'augmenter depuis une vingtaine d'années; et le DT1 est diagnostiqué chez des enfants de plus en plus jeunes. C'est pourquoi il est nécessaire d'identifier les mécanismes qui induisent la rupture de tolérance au soi à l'origine de la maladie afin d'en prévenir l'apparition chez les sujets à risque et de découvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour les malades.

Les îlots de Langerhans, comme les ganglions pancréatiques, sont innervés par des fibres sympathiques, qui relarguent des neurotransmetteurs, ils peuvent également être exposés à l'adrénaline circulante sécrétée en cas de stress. Les cellules immunitaires expriment des récepteurs adrénergiques et sont sensibles à ces hormones de stress. Parmi ces récepteurs, le récepteur β 2-adrénergique, codé par le gène *Adrb2*, est exprimé notamment par les cellules dendritiques, qui jouent un rôle clef dans l'activation des réponses immunitaires.

L'étude de la souris NODL_{tj}, modèle murin spontané de DT1, a permis des avancées majeures dans la compréhension des mécanismes impliqués dans la pathologie. S'il existe des facteurs génétiques

de prédisposition à la maladie, plusieurs études ont également mis en évidence le rôle des facteurs environnementaux comme l'exposition à des dérivés bactériens qui pourrait avoir un rôle protecteur.

Ce projet a pour but principal d'explorer les conséquences d'une interruption de la signalisation β 2-adrénergique sur l'auto-immunité et s'appuie notamment sur une lignée de souris NODL_{tj} invalidée pour le récepteur β 2-adrénergique. Dans la mesure où les catécholamines sont également impliquées dans la régulation du métabolisme du glucose, des paramètres biochimiques seront également analysés chez le jeune animal.

Aucun modèle de culture cellulaire/in vitro ne permet d'étudier de manière intégrative les interactions complexes entre système immunitaire et système neuroendocrinien, ce qui rend l'animal irremplaçable. Le nombre de souris nécessaire à ce protocole s'élève à 471. Les procédures utilisées sont de type léger à modéré, plusieurs paramètres seront analysés sur chaque animal afin d'en réduire le nombre. Enfin, en ce qui concerne le raffinement, une surveillance particulière des souris sujettes à développer un DT1 sera effectuée dans le but de réduire tout inconfort et toute douleur.

8136 Ce projet propose des techniques de chirurgie dans des modèles rongeurs « à façon » sur la base d'une structure génétiquement modifiée (lignées ciblées) répondant aux besoins particuliers des projets scientifiques des aires thérapeutiques. Ces modèles génétiquement modifiés peuvent en effet nécessiter des actes chirurgicaux : castration, implantation de mini-pompe ou d'implants hormonaux pour des stimulations pharmacologiques ou immunologiques (immunosuppression ou immunostimulation) afin de répondre plus spécifiquement à une problématique scientifique.

L'objectif est de produire des animaux ciblés avec des caractéristiques génétiques et physiologiques particulières pour soutenir les axes des équipes de recherche dans la lutte contre les maladies comme Alzheimer, les problèmes cardiovasculaires ou le cancer et permettre ainsi d'aboutir à des modèles rongeurs (souris, rats) présentant les stades précoces de ces maladies et offrant de nouvelles possibilités pour tester de futurs candidats-médicaments. L'approche de maximaliser les modèles sur fond génétiquement modifié vise à raffiner pour être au plus proche de la pathologie « cible » et réduire le nombre d'animaux nécessaires aux expérimentations.

L'espèce de choix est principalement la souris génétiquement modifiée mais aussi parfois le rat.

L'effectif produit est estimé en fonction de la demande de services spécifiques en support aux projets de recherche et n'excédera pas 350 animaux par an soit un effectif maximal de 1050 animaux sur une durée de 3 ans pour ce projet.

Les études menées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes, intégrant tous les aspects affectant l'utilisation des animaux (éthique, hébergement, soins, manipulations, expérimentation) et ayant pour objectif de prévenir toute douleur ou détresse chez l'animal (utilisation d'anesthésiques et d'antalgiques). Dans le cadre de modèles chirurgicaux, l'utilisation d'antalgiques au sein de protocoles déjà établis, et l'ajustement des types de litières contribuent au raffinement de la période post-chirurgicale. Chaque fois que les cultures cellulaires suffisent à couvrir les besoins des chercheurs, celles-ci sont utilisées sans recours ultérieur à l'animal.

8137 Dans la polyarthrite rhumatoïde (PR), les cellules du système immunitaire s'attaquent aux articulations en produisant des autoanticorps. Les autoanticorps appelés ACPA sont présents chez plus de 2/3 des patients. Les autoanticorps ACPA sont dirigés contre les résidus citrulline de plusieurs protéines.

Les protéines peptidyl arginine deiminases (PAD) convertissent les résidus arginine en citrulline sur les protéines qu'elles fixent. Cette modification est présente chez tous les individus, par contre seuls les patients atteints de PR ont des autoanticorps contre les protéines citrullinées.

On ne sait pas pourquoi et comment ces autoanticorps sont produits. Nous voulons tester si les protéines PAD sont responsables de la production des autoanticorps ACPA dans la PR.

Un modèle animal permettra de suivre in vivo les effets de la réponse immune contre les protéines PAD en analysant à la fois la réponse humorale et cellulaire de la souris. Il n'existe pas d'autre alternative à l'expérimentation animale qui permettrait d'analyser globalement la réponse immune contre les PADs et les protéines citrullinées et de voir les effets possibles sur le développement d'arthrite.

Chez l'homme, il est difficile de suivre la réponse immune contre les PAD et l'apparition des autoanticorps ACPA car ils peuvent apparaître avant les signes cliniques de la maladie. C'est la raison pour laquelle, nous voulons étudier la réponse immune contre les protéines PAD et ses conséquences dans des modèles murins.

Pour cela, nous allons injecter les protéines PAD2 et PAD4 (les 2 formes présentes dans l'articulation des patients atteints de PR) à des souris de fonds génétiques différents (susceptibles ou protecteurs pour le développement de la polyarthrite). Nous allons suivre la réponse des lymphocytes T contre PAD et la production d'anticorps anti-PAD chez ces souris ainsi que la production d'anticorps anti-protéines citrullinées. En pratique, nous allons suivre pendant 65 jours l'effet de l'immunisation de 5 protéines (PAD2 murine et humaine, PAD4 murine et humaine et une protéine contrôle BSA) sur 30 souris de plusieurs fonds génétiques.

Le protocole a reçu un avis favorable du Ministère en janvier 2017. L'objet de cette nouvelle demande est de tester des souris porteuses d'autres fonds génétiques pour confirmer nos premiers résultats et tester l'influence des allèles HLA-DR. Nous voudrions utiliser des fonds génétiques susceptibles (des souris C57BL/6 exprimant soit l'allèle HLA-DRB1*04 : 01 ou l'allèle HLA-DRB1*04 : 04 ou exprimant les 2 allèles HLA-DRB1*04 : 01 et HLA-DRB1*04 : 04), des fonds génétiques protecteurs (des souris BALB/c, des C57BL/6 exprimant l'allèle HLA-DRB1*04 : 02) ou des souris C57BL/6 exprimant un allèle protecteur HLA-DRB1*04 : 02 associé à l'allèle de susceptibilité HLA-DRB1*04 : 01 ou à l'allèle de susceptibilité HLA-DRB1*04 : 04. Nous voulons utiliser 1050 souris pour faire une analyse par des tests de Student. Ces tests permettront de comparer quantitativement la réponse humorale et cellulaire entre les groupes de souris. Cela permettra de comparer nos résultats avec ceux du protocole qui a reçu un avis favorable du Ministère en 2017 utilisant la même analyse statistique. Le nombre de souris par cage sera de 4.

Une anesthésie gazeuse à l'isoflurane sera réalisée pour chaque prélèvement de sang dans la veine mandibulaire (soit 4 prélèvements de sang par souris). Les souris seront euthanasiées par dioxyde de carbone à la fin du protocole pour analyser leur réponse lymphocytaire T.

Le bien être des souris sera évalué par le responsable du projet et les zootechniciens. Une grille d'évaluation de la souffrance de l'animal sera faite pendant la durée du protocole. Chaque cage sera pourvue d'un enrichissement (jeu et de coton) pour améliorer l'habitat des souris pendant le protocole.

8138 En recherche scientifique, comprendre et analyser de façon très précise l'anatomie d'un système sont des approches en continuelle progression de par les nouvelles technologies permettant ces investigations.

Le présent projet a pour but l'élaboration d'atlas en trois dimensions des populations cellulaires exprimant des protéines, des neuropeptides et des enzymes spécifiques impliquées dans les régulations neuroendocriniennes. Quatre types de populations cellulaires seront cartographiés sur deux organes jouant un rôle primordial dans les régulations neuroendocriniennes, le système nerveux central et la glande surrénale.

Le modèle animal ne peut pas être remplacé dans ce projet, les atlas étant réalisés à partir d'organes prélevés. Le modèle choisi pour ce projet est le modèle murin, plus spécifiquement la souche de souris C57Bl/6J. Ce modèle possède les propriétés physiologiques qui répondent le mieux à nos questions scientifiques, tout en palliant aux contraintes de la technique. Ces cartes une fois réalisées seront des outils accessibles pour la communauté scientifique et pourront servir de référence pour toutes les études utilisant le même modèle souche de souris ayant comme fond génétique la souche C57Bl/6J.

La technique utilisée permet de créer des atlas sur des animaux à différents stades de développement, nous souhaitons réaliser ces cartographies sur des modèles de souris à différents stades du développement, du stade E11 (embryon au 11ème jour de gestation) à P21 (souris à 21 jours postnatal) et des souris adultes (P90). Les études post-natales devront être réalisées, pour des questions scientifiques, sur des modèles d'animaux mâles.

Pour réaliser ces atlas nous aurons besoin de 724 animaux. Dans un souci de réduction du nombre d'animaux utilisés chaque animal permettra l'élaboration d'atlas de différents organes.

Nombre d'animaux :

-11 stades de développement embryonnaire, de E11 à E21, avec 5 animaux par stade et 4 protéines étudiées, soit $4 \text{ (facteurs étudiés)} * 5 \text{ (nombre d'animaux/stade)} * 11 \text{ (stades étudiés)} = 220$ animaux sont nécessaires.

-nombre de femelles gestantes, en considérant des portées de 6 embryons par femelle, pour 4 protéines étudiées 4 femelles gestantes par stade sont nécessaire, soit $4 \text{ (nombre de femelle/stade)} * 11 \text{ (stades étudiés)} = 44$ femelles sont nécessaires.

-23 stades postnatals, de P0 à P21 plus un stade adulte de 3 mois (P90), avec 5 animaux par stade et 4 protéines étudiées, soit $4 \text{ (facteurs étudiés)} * 5 \text{ (nombre d'animaux/stade)} * 23 \text{ (stades étudiés)} = 460$ animaux sont nécessaires

Au total $220+44+460= 724$ animaux pour ce projet scientifique.

Tous les animaux utilisés seront issus de l'élevage de l'animalerie. Dans un souci de bien-être les animaux seront, avant la mise à mort pour prélèvement, placés dans les conditions réglementaires d'élevage (nourriture/eau ad libitum, cycle jour/nuit 12h/12h, condition d'hébergement adapté à l'espèce, enrichissement du milieu). Un suivi quotidien des animaux est pratiqué pour déceler toute détérioration de l'état de santé ou signe de souffrance (points limites définis).

8139 Les glioblastomes sont des tumeurs du cerveau pour lesquels, il n'y a pas, actuellement, de traitement satisfaisant. En effet, malgré une prise en charge des patients incluant une chirurgie, de la radiothérapie et de la chimiothérapie, la récurrence est quasi systématique. Dès lors le développement de nouvelles modalités thérapeutiques, telles que les thérapies géniques, constitue un espoir important. L'inhibition sélective de gènes est une technique prometteuse qui a déjà montré son efficacité sur des cellules en culture. Cependant l'utilisation de cette technique à des fins thérapeutiques est limitée et reste peu efficace. L'objectif de ce projet est donc de développer des outils thérapeutiques qui permettraient d'agir, localement et efficacement, sur un gène cible des glioblastomes. Notre outil sera d'abord validé sur des cellules en culture puis testé sur des souris. Pour notre étude, nous utiliserons des cellules tumorales de glioblastomes génétiquement modifiées. Ces cellules seront injectées aux souris, sans présenter de phénotype dommageable, pour générer des tumeurs sous-cutanées ou dans le cerveau. Pour nous permettre de suivre la pousse des tumeurs ainsi que l'efficacité de notre outil thérapeutique nous utiliserons des techniques d'imagerie optique. Ces méthodes d'imagerie nous permettent de réaliser un suivi longitudinal (dans le temps) sur un même animal.

Le nombre total d'animaux pour ce projet est de 72 souris (48 modèles sous cutanés : 8 conditions testées, 6 souris par conditions et 24 modèles intracérébrales : 4 conditions testées, 6 souris par condition).

Remplacement, réduction, raffinement : l'utilisation des animaux est indispensable pour reproduire les mécanismes complexes liés aux tumeurs et de ce fait ne peuvent être remplacés. Le nombre d'expérimentations sera réduit de la façon suivante : les outils thérapeutiques développés seront dans un premier temps testés sur des cultures en culture pour leur toxicité et leur efficacité. Ainsi, seul l'outil ayant démontré une absence de toxicité et une efficacité suffisante sera injecté aux animaux. L'imagerie optique est une technique d'imagerie non invasive qui permet de faire un suivi longitudinal permettant ainsi la réduction du nombre d'animaux. Pour le modèle de tumeur sous cutanée nous avons la possibilité d'injecter 2 tumeurs par animal ce qui nous permettra de tester 2 conditions par animal réduisant ainsi le nombre d'animaux au final. C'est seulement une fois les conditions optimales définies que nous passerons sur un modèle de tumeur intracérébrale.

8140 Cette formation a pour but d'initier les participants à l'imagerie préclinique in vivo. L'imagerie préclinique in vivo permet de mettre en évidence de nouvelles cibles thérapeutiques et d'évaluer rapidement de nouvelles stratégies médicales. Au cours de cette école les principes théoriques mais également les aspects pratiques de chaque technique d'imagerie seront abordés. Des modèles murins immunocompétents seront générés afin de mettre en pratique les modalités d'imagerie abordées.

Le nombre total d'animaux est 18 souris (10 modèles sous cutanés, 4 modèles de métastases et 4 modèles de tumeur intraprostatique).

Remplacement, réduction, raffinement : le remplacement n'est pas possible puisque des travaux pratiques sur les modalités d'imagerie sur des modèles murins sont au programme. Le nombre d'animaux sera réduit de la façon suivante : l'imagerie optique et échographique est une technique d'imagerie non invasive, nous pourrions utiliser un même modèle murin pour plusieurs ateliers. Les animaux sont surveillés quotidiennement par le personnel de l'animalerie et/ou l'expérimentateur. Les animaux sont hébergés en fratrie en présence d'un enrichissement du milieu. Toutes les procédures sont réalisées sur animal anesthésié et lors de l'anesthésie les animaux sont placés sur un tapis chauffant. Lors d'un acte chirurgical, la gestion de la douleur est prise en compte par l'administration d'analgésiques. Au moindre signe de souffrance de l'animal l'expérimentation est stoppée.

- 8141** L'existence de nombreux modèles animaux d'hypertension artérielle (HTA) spontanée ou expérimentalement induite a permis de mieux comprendre les mécanismes pathogéniques impliqués dans le développement de cette affection. Le rat spontanément hypertendu (SHR) est un modèle d'HTA couramment utilisé dans l'étude de l'HTA essentielle. Cette souche de rongeur est élevée par un partenaire depuis plusieurs années. Afin de s'assurer du développement de l'HTA et d'éviter l'apparition de dérives génétiques dans ce modèle, l'éleveur partenaire procède à des évaluations phénotypiques, incluant notamment le contrôle de la pression artérielle chez les couples reproducteurs ainsi que chez les rats SHR appartenant à des portées différentes.

Le principal objectif de cette étude consistera à détecter, à l'aide d'approches indirecte (technique de pléthysmographie caudale) et directe (mesure invasive carotidienne) la présence de l'HTA chez des rats SHR jeunes appartenant à des générations ou des portées différentes. De plus, suite aux mesures de la pression invasive, les rats seront immédiatement euthanasiés. Puis, l'impact sur la fonction endothéliale et la contractilité cardiaque de l'HTA sera étudié respectivement sur des aortes isolées et sur cœur isolé perfusé par la construction de courbes concentration-réponse cumulatives à des substances pharmacologiques interférant notamment avec le système adrénergique. Ce projet s'inscrit dans le cadre de la nouvelle thématique de notre unité de recherche dont un des objectifs est d'identifier des thérapeutiques innovantes afin de lutter contre le syndrome métabolique chez le rat spontanément hypertendu. L'étude de l'HTA chez les différentes portées permettra de sélectionner pour nos études celle ayant le profil hypertendu le plus élevé et sans dérive génétique.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R. L'utilisation de cette souche de rat est complètement maîtrisée dans notre équipe. Les trois approches expérimentales abordées dans ce travail sont complémentaires. On ne peut envisager d'étudier exclusivement par l'approche pléthysmographique l'HTA et ses conséquences cardiovasculaires qui lui sont associées.

De plus, il n'existe pas de modélisation mathématique ou in silico qui permettent de contrôler l'HTA dans ce domaine. Le nombre d'animaux (3 rats x 60 portées, soit 180 rats au total) est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse descriptive. Le bien-être des animaux est surveillé tout au long du protocole par leur observation quotidienne. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

- 8142** Les canaux ioniques sélectifs au sodium et dépendants du potentiel (Nav) jouent un rôle majeur dans l'excitabilité neuronale. Les mutations qui affectent ces canaux, en particulier les canaux Nav1.2, sont à l'origine de troubles du spectre autistique et/ou d'épilepsie pouvant, pour les formes les plus sévères, être associée à un déficit intellectuel.

Les altérations de l'excitabilité neuronale consécutives au dysfonctionnement de ces canaux ainsi que les mécanismes impliqués dans l'apparition de ces différents symptômes chez l'enfant restent à élucider. Pour ce faire, nous utiliserons des souris déficientes en canaux Nav1.2 afin de reproduire un type de mutations identifié chez l'homme. Notre projet de recherche vise à caractériser le phénotype comportemental de ces souris au cours du développement et à l'âge adulte. Plusieurs approches in vivo seront réalisées : la 1^{ère} consistera à implanter des électrodes, sous anesthésie générale, et à enregistrer l'activité électrique corticale chez l'animal vigile afin de mettre en évidence d'éventuelles crises d'épilepsie et de les caractériser. La 2^{ème} approche sera basée sur l'utilisation

de différents tests comportementaux afin de mettre en évidence des anomalies comportementales similaires aux symptômes observés chez l'homme dans les troubles du spectre autistique et les différentes formes d'épilepsie. Enfin, la dernière approche consistera à administrer aux souris des molécules afin d'empêcher l'apparition de troubles épileptiques et/ou autistiques.

Afin de répondre au principe de remplacement, nous réaliserons, parallèlement aux expérimentations *in vivo*, des études sur culture de neurones et tranches de cerveau *ex vivo*.

Afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, les mêmes souris seront étudiées successivement 3 semaines après la naissance puis à l'âge adulte dans chacun des différents tests comportementaux. De la même manière, les mêmes groupes de souris seront utilisés pour tester l'efficacité d'une molécule dans plusieurs tests comportementaux. A la fin des expériences, les cerveaux des animaux seront prélevés afin d'effectuer des analyses histologiques ou moléculaires.

Enfin, toutes les mesures seront prises pour éviter toute souffrance ou inconfort à l'animal. Un suivi journalier permettra d'évaluer leur état de santé et ainsi d'intervenir rapidement par rapport aux points limites définis. Un nombre maximal de 320 souris sera utilisé pour cette étude.

8143 La pollution environnementale représente une menace croissante pour les pays industrialisés ou en voie de développement. Elle est associée à de nombreuses pathologies (asthme, diabète, cancer...). Les organismes vivants ont développé des systèmes de détection des polluants environnementaux (dioxines, hydrocarbures) les récepteurs de xénobiotiques, comme l'AhR (Aryl hydrocarbon Receptor) qui détecte plusieurs familles d'hydrocarbures fortement représentés dans l'environnement (dioxines, hydrocarbures aromatiques...). Son rôle est bien caractérisé chez les mammifères, mais des études récentes suggèrent toutefois que l'AhR est impliqué dans des fonctions endogènes indépendamment de sa liaison aux xénobiotiques. En effet, plusieurs groupes ont souligné son importance dans l'hématopoïèse et plus précisément lors de la mégacaryopoïèse, le mécanisme physiologique qui conduit à la production de plaquettes sanguines. L'AhR est impliqué dans la prolifération des cellules souches hématopoïétiques (CSH), leur engagement dans la voie de la mégacaryopoïèse. Cependant, l'impact de l'AhR sur les fonctions plaquettaires n'a pas ou peu été exploré, c'est pourquoi à l'aide de souris déficientes pour le gène de l'AhR spécifiquement dans la lignée mégacaryoblastique, nous nous proposons d'étudier plus finement son rôle

Les expériences consisteront d'une part en des prélèvements de sang pour réaliser des mesures *ex vivo* de réactivité des plaquettes sanguines et d'autre part en la mesure du temps de saignement suite à une coupure au niveau de la queue de l'animal. L'absence d'AhR n'est pas délétère pour les souris et n'est pas décrit pour avoir des répercussions néfastes sur leur qualité de vie. Nous serons attentifs à être en adéquation avec la règle des 3R. Réduire. Réduction. Une même souris sera utilisée pour plusieurs types d'expérience et comme nous maîtrisons l'ensemble des techniques mises en œuvre dans ce projet, aucune mise au point préalable n'est nécessaire. Le nombre d'animaux utilisés pour cette étude est calculé au plus près afin de permettre une analyse statistique des données (Test de student). Remplacer. Les plaquettes étant des éléments anucléés, elles ne sont pas manipulables génétiquement et l'utilisation de souris est donc incontournable. Raffinement. Une attention particulière est portée au bien-être des animaux. Raffinement. Pour chaque procédure, les animaux sont anesthésiés et un traitement approprié contre la douleur leur est administré. Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton compressé et de la frisure de papier ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Les animaux entre 2 et 6 par cage, ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. L'étude se fera sur 64 souris.

8144 L'accident vasculaire cérébral (AVC), la sclérose en plaque (SP) et les traumatismes cérébraux représentent des problèmes majeurs de santé publique avec un coût socio-économique considérable compte tenu de leur prévalence croissante, de l'absence de traitement efficace et du caractère fortement invalidant de ces pathologies. Bien que ces pathologies résultent de mécanismes spécifiques conduisant à des troubles fonctionnels différents, l'activation de processus inflammatoires constitue une caractéristique physiopathologique commune avec des conséquences neurotoxiques similaires. Si la finalité de cette réponse inflammatoire est le rétablissement de l'homéostasie tissulaire, l'évolution de cette réponse inflammatoire au sein du système nerveux central (SNC) vers

une forme chronique peut, selon les contextes physiopathologiques, initier certains processus neurodégénératifs ou à minima contribuer à l'aggravation des lésions. La réponse inflammatoire tissulaire est sous contrôle de cellules immunocompétentes résidentes spécifiques de cet environnement tissulaire. Dans le système nerveux central (SNC), l'inflammation repose sur l'activation des cellules astrocytaires mais surtout des cellules microgliales, uniques cellules immunocompétentes résidentes du parenchyme cérébral. L'activation microgliale peut revêtir selon l'évolution de l'environnement tissulaire un caractère neuroprotecteur ou neurotoxique. Il apparaît donc que les cellules microgliales sont capables d'adapter leur réponse selon la nature des stimuli environnementaux et ainsi d'assurer l'homéostasie tissulaire. Ainsi il apparaît que la réorientation in vivo des réponses microgliales vers leur phénotype neuroprotecteur M2 pourrait permettre d'enrayer certains processus physiopathologiques responsables de la neurodégénérescence et promouvoir les mécanismes de réparation tissulaire contribuant ainsi à une amélioration de la restauration fonctionnelle dans la plupart des pathologies neurodégénératives.

De précédents travaux ont récemment démontré que la transplantation de cellules ES génétiquement modifiées pour exprimer le neuropeptide PACAP améliorerait la restauration fonctionnelle dans un modèle murin d'ischémie focale permanente. Cette réduction des déficits fonctionnels apparaît associée au potentiel immunomodulateur du neuropeptide et plus spécifiquement à sa capacité à réorienter la réponse microgliale vers un phénotype neuroprotecteur M2-like. La transplantation in vivo de cellules ES dans le contexte de stratégies de thérapies cellulaires étant exclue, nous souhaitons développer une approche similaire basée sur l'utilisation de cellules souches dérivées de tissu adipeux humain (hADSC). Ces cellules feront l'objet d'une transduction virale leur conférant la propriété d'exprimer et libérer le neuropeptide immunomodulateur. Le potentiel thérapeutique de cette stratégie de thérapie cellulaire sera évalué dans des modèles murins d'ischémie cérébrale, de traumatisme de la moelle épinière et de sclérose en plaque. Cette étude permettra de comprendre l'évolution de la réponse inflammatoire dans différents modèles de pathologies, de mieux comprendre l'interaction entre la réponse inflammatoire et la récupération fonctionnelle et de valider notre stratégie d'immunomodulation comme stratégie thérapeutique applicable à tout trouble neurodégénératif à composante inflammatoire.

Cette demande d'autorisation concerne ici exclusivement le modèle d'ischémie cérébrale, les autres modèles murins de pathologie seront réalisés dans d'autres laboratoires avec lesquels nous collaborons dans lesquels ces modèles sont déjà mis en place.

Cette étude préclinique doit permettre d'évaluer la récupération fonctionnelle post-ischémique consécutive à l'administration de cellules souches humaines dérivées de tissu adipeux génétiquement modifiées et les différents mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents. 400 souris mâles C57Bl/6 seront requises pour mener à bien ce projet. Ce nombre est basé sur le nombre minimal de souris nécessaire pour la validation statistique des résultats obtenus tout en anticipant le nombre d'échec et la mortalité lié au modèle expérimental mis en œuvre. Les animaux seront nourris et abreuvés ad libitum, hébergés dans des cages pourvues d'enrichissement en armoire ventilée (atmosphère contrôlée : température et hygrométrie) selon un cycle de 12h jour/nuit. Dans la mesure du possible, les animaux seront au minimum 2 par cage afin de respecter le caractère social des souris. Une ischémie cérébrale obtenue par électrocautérisation de l'artère cérébrale moyenne (ACM) droite sera réalisée 3 jours avant administration des cellules hADSC puis la récupération fonctionnelle des animaux sera évaluée via des tests comportementaux à différents temps après ischémie. Si l'électrocautérisation de l'ACM engendrera durant les premiers jours certains déficits moteurs des membres supérieurs et inférieurs gauches ainsi que des problèmes de mastication liés à la désinsertion du muscle maxillaire durant le protocole chirurgical, l'administration des cellules hADSC devrait réduire rapidement les déficits fonctionnels. Toutes les dispositions seront prises afin de minimiser la souffrance et l'anxiété des animaux. Des anesthésiques seront utilisés au cours de la chirurgie, en combinaison avec des analgésiques injectés en pré- et post-opératoire. De la nourriture ramollie sera placée à même la litière des animaux afin de faciliter leur alimentation. Une observation ainsi qu'une évaluation pluriquotidienne de l'état des animaux pendant les 72h post-opératoires puis quotidienne jusqu'à l'arrêt de l'expérimentation seront réalisées. Selon la sévérité de la souffrance animale observée, les animaux recevront des antalgiques si souffrance modérée ou seront euthanasiés en cas de souffrance excessive. Il est à noter que les procédures envisagées ne devraient pas générer de souffrance animale excessive nécessitant l'euthanasie des animaux.

8145 Le projet a pour but de d'évaluer l'efficacité d'un médicament destiné au chien contre une pathologie canine.

Pour qu'un médicament soit autorisé, il faut notamment démontrer que celui-ci apporte un effet bénéfique sur l'animal pour la pathologie considérée. Les études sont réalisées sur l'espèce cible (chien) pour s'approcher au mieux des conditions réelles d'utilisation.

Pour démontrer l'efficacité d'un médicament contre cette pathologie canine, une phase d'épreuve suit la phase d'administration de ce médicament. L'épreuve correspond à l'administration de l'agent pathogène cible pour reproduire la pathologie expérimentalement plus fidèlement possible à la réalité.

Les objectifs du projet sont a) la mise au point d'un modèle d'épreuve et b) l'évaluation de l'efficacité du médicament pour le chien lors de l'épreuve.

Avantages et dommages :

Le développement de la maladie chez l'animal peut donner lieu à des signes cliniques provoquant une gêne ou une douleur chez l'animal. Par ailleurs l'administration du médicament, du pathogène et les prélèvements peuvent générer du stress et une gêne. Pour limiter les contraintes induites par ces actes, les procédures sont réalisées par des opérateurs hautement qualifiés. De plus, des points limites spécifiques à la pathologie sont appliqués.

L'intérêt final de ces études est de permettre le développement de médicaments efficaces pour réduire l'impact de cette pathologie canine.

Informations sur les espèces utilisées :

En se basant sur l'historique du médicament testé, les exigences réglementaires et des projets de Recherche et Développement à venir, le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans est estimé, au plus, à 225 chiens.

Mise en œuvre des 3Rs :

Remplacement : Une première étape dans le projet de développement d'un médicament consiste à tester in vitro différents candidats. Ceci a permis et permettra une première sélection de ces derniers, réduisant ainsi le nombre de candidats à tester in vivo donc le nombre d'animaux utilisés. Un recueil d'informations est aussi apporté par la bibliographie.

Le recours à l'espèce cible est à l'heure actuelle indispensable, les résultats obtenus in vitro et sur espèces alternatives n'étant pas complètement extrapolables.

Réduction : Les effectifs sont évalués au plus juste (analyse statistique, historique, définition des objectifs...) de façon à minimiser le nombre de chiens tout en permettant d'interpréter les résultats des études.

Raffinement :

Des points limites spécifiques à la pathologie concernée ont été définis. Ces critères sont en constante évolution de manière à ce qu'ils reflètent au mieux l'expérience du terrain et l'état actuel des connaissances vétérinaires. Le personnel est compétent pour identifier les cas où l'animal n'est plus dans sa zone de confort. Une anesthésie et une analgésie peuvent être réalisées lors de certains actes, si nécessaire.

Les conditions d'hébergement sont adaptées à l'espèce et à l'âge des animaux pour maximiser leur confort et leur bien-être.

Dans la majorité des cas, tous les animaux sont hébergés en groupe. Des enrichissements adaptés au milieu sont mis en place. La Structure du Bien Etre Animal (SBEA) garantit l'amélioration des techniques de soins et des conditions de vie des animaux.

8146 Dans le cadre des activités de recherche, pour découvrir ou développer de nouvelles solutions thérapeutiques, un certain nombre d'étapes nécessitent le recours à l'animal de laboratoire. Les protocoles in vitro et ex vivo permettent de limiter le nombre d'études sur animaux, mais nécessitent néanmoins de disposer de fluides biologiques, tissus et/ou organes.

Ce projet décrit les modalités de prélèvement de fluides biologiques, tissus et/ou organes. Les prélèvements réalisés dans ce cadre serviront notamment à la mise en culture de cellules, à l'étude de tissu isolé, à la validation de dosages et contribueront ainsi à la qualité de la sélection de candidats médicaments et des analyses d'échantillons d'études. Ils seront réalisés par du personnel dûment formé à ces techniques, tout en respectant les recommandations éthiques internes spécifiques à chaque espèce, relatives aux modalités d'hébergement, d'enrichissement du milieu, d'expérimentation et visant à prévenir toute douleur ou détresse de l'animal. Ainsi, selon les particularités liées aux espèces et/ou aux modalités des prélèvements, seront privilégiés les hébergements en groupe avec enrichissements tels que tunnels en carton, paperwool, bâtonnets à ronger les habitudes aux manipulations et l'utilisation de moyens analgésiques et/ou d'anesthésiques appropriés, si nécessaire(s).

Afin de réduire le nombre global d'animaux utilisés dans notre Centre de Recherche, les prélèvements seront réalisés en priorité sur des animaux provenant d'autres projets (réutilisation après avis favorable vétérinaire).

Le nombre d'animaux utilisés sur 5 ans, ayant été défini à partir de l'historique des besoins identifiés au sein des différentes équipes de recherche, sera au maximum de : 5000 souris, 500 rats, 100 cobayes.

8147 La Sclérose Latérale Amyotrophique (SLA) est une maladie neurodégénérative fatale, le décès du patient intervenant en moyenne trois à cinq ans après le diagnostic. Il s'agit de la maladie du motoneurone la plus fréquente chez l'adulte, caractérisée par la perte des motoneurons qui entraîne une atrophie musculaire et une paralysie progressive.

La SLA est une maladie multifactorielle dans laquelle la dégénérescence des neurones sérotoninergiques centraux a été décrite, ainsi qu'une surexpression du récepteur 2B de la sérotonine (5-HT_{2B}) dans la moelle épinière des modèles murins. Une étude a démontré que le blocage de ce récepteur conduit à l'aggravation de la maladie. Nous proposons dans ce projet d'évaluer les effets de la stimulation pharmacologique du récepteur 5-HT_{2B} dans deux modèles génétiques murins de SLA (SOD1 G86R et FUS delta NLS). Notre hypothèse est qu'une stimulation de ce récepteur pourrait ralentir la progression de la SLA en participant au maintien des unités motrices. Cependant, les molécules qui stimulent ce récepteur 5-HT_{2B} sont connus pour provoquer des atteintes valvulaires cardiaques et de l'hypertension artérielle pulmonaire (Cf. Médiator*). Des travaux préliminaires nous ont permis d'identifier une substance qui stimule ce récepteur (α), n'induisant pas d'atteintes valvulaires. Nous voulons évaluer ce composé, ainsi que deux de ses analogues structuraux (AS α 1 et AS α 2), comparativement au traitement de référence dans la SLA : le riluzole et à un stimulant de ce récepteur connu pour provoquer des valvulopathies (β). Les critères de jugement pour ce projet sont une étude de survie (modèle SOD1 G86R), ainsi qu'une évaluation neurologique et cardio-pulmonaire (au stade ultime de la pathologie et dès l'apparition des symptômes pour le modèle SOD1 G86R, au début de la perte des motoneurons pour le modèle FUS delta NLS, soit environ 6 mois).

Conformément à la règle des 3R, une attention particulière a été portée sur l'optimisation des protocoles. L'aboutissement du projet nécessitera l'inclusion de 420 animaux dont 360 souris SOD1 G86R (60 souris des deux sexes par groupe de traitement), 30 souris FUS delta NLS (10 souris/groupe de traitement) et 30 souris littermate, contrôles des FUS delta NLS non-transgéniques (10 souris/groupe de traitement). Le nombre d'animaux retenus intègre la variabilité expérimentale associée aux procédures exploratoires. La lignée SOD1 G86R a été retenue car il s'agit d'un modèle de référence dans les études sur la SLA, et a permis d'obtenir les résultats préliminaires à notre projet. La lignée FUS delta NLS a été retenue (i) afin de confirmer les résultats dans une seconde lignée (consignes internationales d'études précliniques sur la SLA), (ii) car la physiopathologie, l'espérance de vie et l'atteinte motrice sont différentes du modèle SOD1 G86R.

Le nombre d'animaux choisis est de 30 souris mâles et 30 souris femelles par groupe de traitement. Dans la mesure où l'un de nos objectifs est d'étudier la survie de ces animaux, la réduction progressive du nombre d'animaux nécessite un effectif suffisant à l'inclusion pour garantir une puissance statistique permettant l'analyse statistique des résultats (courbe de Kaplan Meier : méthode classique d'estimation de la probabilité de survie sur un intervalle de temps donné). Ainsi, le nombre de souris incluses dans le projet est lié à la nature des tests statistiques utilisés (analyse de variance) aussi

bien pour les tests fonctionnels, que les analyses histologiques ou moléculaires. L'enrichissement de l'environnement et une surveillance quotidienne permettront de détecter rapidement et de limiter la souffrance des animaux (points limites spécifiques des modèles de SLA (animaux à phénotype dommageable et grille de notation jointe), et ainsi de s'assurer de leur bien-être (mise à disposition dans la cage de nourriture hydratée dès apparition des premiers signes d'atteintes motrices). Nous avons également favorisé au maximum des tests non-invasifs pour étudier les fonctions motrices des animaux. A l'issue du protocole, les animaux seront mis à mort par surdosage d'anesthésique, les tissus perfusés et prélevés. La SLA est une maladie d'origine plurifactorielle et multicellulaire. Les cultures cellulaires ne permettent pas de modéliser de façon satisfaisante la complexité des unités motrices. Nous avons donc besoin de recourir à un modèle animal pour ce projet de recherche. Le choix des molécules stimulant le récepteur 5-HT_{2B} a été orienté grâce à des études de pharmacologie réalisées in vitro.

8148 Notre projet de recherche consiste à utiliser des souris pour produire des anticorps monoclonaux contre des cibles retrouvées dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson. La cible privilégiée est le peptide A β

Le peptide A β est un peptide de 40 à 42 aminés. Elle est principalement localisée dans le cerveau mais elle est également retrouvée dans la circulation sanguine. Elle provient de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), une glycoprotéine transmembranaire qui a des fonctions dans la synaptogenèse, la migration neuronale, l'adhésion cellulaire et la signalisation cellulaire.

L'agrégation peptide A β entraîne des dommages irréversibles sur les neurones dans la maladie d'Alzheimer.

Les souris prévues pour la mise en œuvre de ce projet sont au nombre de 3 par peptide testé avec un total de 45 souris.

Les anticorps sont des outils à utiliser pour des fins diagnostics ou thérapeutiques. La majorité des anticorps est obtenue chez l'animal malgré des tentatives pour les produire avec des cellules. Cependant ces derniers sont de mauvaise qualité, coûteux et parfois ne sont pas aboutis.

REDUIRE : Des tests statistiques sont utilisés afin d'obtenir le nombre d'animaux nécessaires par groupe expérimental et d'obtenir ainsi des résultats exploitables. Pour chaque peptide, 3 souris sont immunisées et à partir des cellules de la rate des souris immunisées qui montrent un bon titre, des clones sont préparés pour la production d'anticorps sans avoir recours de nouveau à l'expérimentation chez l'animal.

RAFFINER : Les prélèvements de sang sont réalisés dans la région maxillo-faciale contrairement aux prélèvements de sang au niveau du sinus retro-orbital plus contraignant pour l'animal. Une désinfection locale de la peau est réalisée avant chaque injection. Les animaux sont observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et euthanasiés en cas de perte significative de poids et d'infection locale cutanée.

REMPACER : Notre société développe des sondes fluorescentes spécifiques du peptide A β dans le but de mettre au point des tests non invasifs pour diagnostiquer la maladie d'Alzheimer, ainsi que des tests sanguins de diagnostic des autres types de maladies neurodégénératives notamment Parkinson). Pour développer des tests non invasifs complémentaires, la société va effectuer la production des anticorps monoclonaux murins dirigés spécifiquement contre des peptides avec des séquences humaines, des peptides d'intérêt des maladies neurodégénératives

8149 Le médulloblastome est une des tumeurs pédiatriques les plus fréquentes et agressives. Le taux de guérison est d'environ 70% mais les traitements associant radiothérapie et chimiothérapie sont excessivement délabrant. De plus, les rechutes sont malheureusement fatales dans la majorité des cas. Aucun traitement conventionnel (radiothérapie et chimiothérapie associées) ou alternatif (ciblant les systèmes vasculaire ou immunitaire, ou encore la réponse inflammatoire) n'est efficace contre ces cancers lors des rechutes. Ceci est dû à : (i) une forte hétérogénéité de la pathologie (4 groupes décrits dont le pronostic vital associé est variable), caractérisée par l'activation de voies de signalisation spécifiques et (ii) une forte propension à développer des résistances aux traitements de référence, induisant la récurrence post-thérapeutique de la maladie. Le but de ce projet est de

comprendre les mécanismes de cette résistance pour (i) identifier des marqueurs biologiques de cet échappement thérapeutique, (ii) adapter le traitement et/ou développer de nouvelles stratégies thérapeutiques ciblant les facteurs impliqués dans la progression.

Nos études réalisées *in vitro* sur plusieurs types de tumeurs, parmi lesquels plusieurs modèles de médulloblastomes, montrent l'implication de deux types de facteurs de croissance, le VEGF-C (facteur de croissance des vaisseaux lymphatiques) et les cytokines de la famille ELR+CXCL (cytokines pro-angiogéniques), dans les phénomènes de progression tumorale sous traitement.

La procédure 1 vise à étudier l'influence du microenvironnement tumoral sur la croissance de la tumeur et sur le développement de l'agressivité tumorale, « quantifiée » par l'apparition de marqueurs d'angiogenèse ou de lymphangiogenèse (VEGF, VEGF-C, LYVE-1, PDPN, etc.). Le but de la procédure est de permettre le développement d'une tumeur dans son environnement habituel, par une greffe de cellules tumorales de souris au cœur même du cervelet de la même espèce. Nous serons donc en mesure de tester *in vivo* les effets de plusieurs traitements chimiothérapeutiques.

Sur le plan éthique et conformément aux exigences de remplacement, réduction et raffinement, les expériences proposées sur les animaux ont été précédées de nombreuses expériences *in vitro* qui permettent de diminuer le nombre d'animaux à utiliser dans les expériences *in vivo*. Une grande importance sera accordée au bien-être des animaux avec un suivi régulier, par un personnel formé à l'expérimentation animale, afin de détecter tout signe de détresse et/ou de souffrance suite aux injections de cellules et traitements administrés. Si de tels signes devaient apparaître, les mesures nécessaires seraient prises grâce à l'application des points limites clairement définis.

Conformément aux recommandations en vigueur, nos souris bénéficient d'un milieu enrichi et l'ensemble des manipulateurs est dûment qualifié et diplômé dans le domaine de l'expérimentation animale.

En vue de futures applications cliniques qui exigent la démonstration d'efficacité de traitement sur au moins un modèle animal, ces études *in vivo* sont nécessaires et non contournables. Nous avons donc réduit à un minimum le nombre d'animaux nécessaires à cette étude, dans le respect de la significativité statistique des résultats que nous en attendons. Ainsi, nous utiliserons pour ce projet d'une année un total de 80 souris Balb/c.

Les souris Balb/c sont immunocompétentes et permettent l'étude de tumeurs dans leur environnement originel. Il est ainsi possible d'obtenir des informations quant à l'importance du système immunitaire.

8150 La myopathie que nous étudions est une maladie musculaire génétique. Elle est caractérisée par une faiblesse des muscles du tronc et du cou, qui conduisent à l'apparition d'une scoliose et d'une insuffisance respiratoire sévères. Ces altérations musculaires apparaissent dès l'enfance et s'aggravent avec l'âge, entraînant une morbidité précoce. Par ailleurs nombreux patients présentent également un diabète associé à un poids faible due à la perte musculaire, et à une augmentation des tissus adipeux. Enfin, les patients souffrent aussi d'un vieillissement prématuré avec une rapide détérioration de leurs capacités physiques.

Les mutations responsables de cette myopathie ont donc des conséquences multiples et néfastes non seulement sur l'activité musculaire, mais également sur le métabolisme énergétique, c'est-à-dire sur la dépense et le stockage de sucres ou de gras dans le corps, et qui conduisent à un vieillissement accéléré des patients.

Nous voulons comprendre les mécanismes responsables du dérèglement de ces trois fonctions pour mettre au point des outils qui permettront de caractériser la pathologie et de trouver des traitements adaptés, car à ce jour, aucun traitement efficace n'existe.

La N-acétylcystéine (NAC) est un traitement dont la faible toxicité a été démontrée pour d'autres pathologies. Nous avons au laboratoire un modèle de souris transgéniques qui reproduit les différentes altérations décrites chez les patients atteints de cette myopathie, nous avons montré que le traitement de ces souris par le NAC rétablit les fonctions musculaires.

Nous voulons maintenant déterminer quelles sont les causes responsables des troubles du métabolisme énergétique et du vieillissement précoce chez les patients et si le traitement par le NAC ou par d'autres médicaments peut corriger ces anomalies.

Nous développerons nos recherches selon 3 axes exposés ci-dessous, selon les principes des 3R, en utilisant des cellules musculaires en culture tant que les expériences le permettront et le modèle de souris transgéniques lorsque les expériences le nécessiteront. Nous avons comptabilisé un total de 732 animaux, pour répondre aux questions ci-dessous :

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

- Caractérisation moléculaire de la fonction mutée et des mécanismes responsables de cette myopathie, tout d'abord dans des cellules musculaires en culture, puis validation dans les muscles de souris myopathes en comparaison des muscles de souris témoins (Remplacement-Réduction).

- Analyse de l'état pathologique général, c'est-à-dire des conséquences sur l'organisme entier, à partir des prélèvements sanguins réalisés sur la même cohorte que celle utilisée pour répondre au point suivant (Réduction).

- Recherche de marqueurs de la myopathie qui permettront d'établir le diagnostic, de suivre son évolution et de suivre les effets du traitement dans les muscles de souris à 5 âges différents (sans alternative).

2) Conséquences de la fonction mutée sur le métabolisme énergétique :

Toutes ces études (mesure de l'activité locomotrice et dépenses énergétiques) sont non invasives et nécessitent d'être réalisées sur l'animal vivant (sans alternative).

- Etude du phénotype métabolique

Une même cohorte de souris âgées de 1 mois, non traitées et traitées par le NAC (distribué dans l'eau de boisson) sera utilisée pour les 3 analyses :

- Caractérisation du métabolisme énergétique chez les souris myopathes en comparaison de souris témoins

- Détermination de l'âge d'apparition des défauts métaboliques chez les souris myopathes

- Effets du traitement NAC sur le métabolisme énergétique des souris myopathes.

- Impact d'une alimentation enrichie en sucre ou en gras sur le métabolisme énergétique des souris myopathes en comparaison de souris témoins :

- Etude de tolérance au glucose et à l'insuline (injection péritonéale) chez les souris myopathes, sur des prélèvements sanguins, puis dans les muscles isolés des mêmes souris (Réduction).

- Etude de l'impact métabolique d'une alimentation enrichie (2 types d'aliments) en comparaison d'une alimentation classique chez les souris myopathes.

- Caractérisation de nouveaux traitements corrigeant le phénotype métabolique des souris myopathes.

3) Conséquences de la fonction mutée dans la formation et/ou la réparation du muscle :

Les 3 analyses réalisées sur des cellules souches issues de muscles sont sans alternative car il n'existe pas de lignée établie de cellules souches musculaires.

- Etude des 3 stades de développement des cellules musculaires (isolées à partir de muscles de souris myopathes en comparaison de souris témoins)

- Effet du NAC et de nouveaux traitements sur le développement des cellules musculaires.

- Production de « lignées » de cellules souches amplifiées par culture (stockées congelées) et comparaison avec les mêmes cellules souches non amplifiées. Expérience réalisée pour réduire considérablement le nombre de souris utilisées dans la suite des projets, car la culture permet d'amplifier les cellules et ainsi d'utiliser pour une même étude, une seule souris au lieu de 5 souris nécessaires pour les cellules souches non amplifiées (Réduction-Raffinement). Aucune des procédures expérimentales proposées dans ce projet n'engendre de douleur. Tout au long de leur vie,

les animaux bénéficient d'une amélioration de l'environnement des cages d'hébergement par ajout de nid végétal et par maintien en groupe de 3-4 animaux, dans le but de diminuer leur stress.

8151 Des études récentes suggèrent que des thérapies du cancer développées récemment pourraient avoir un impact négatif sur le fonctionnement du système nerveux central. Il est reporté chez les patients recevant ces thérapies ciblées, une fatigue, des troubles de l'humeur (anxiété, dépression), des modifications des comportements alimentaires, des déficits de mémoire, qui peuvent grandement altérer la qualité de vie de ces patients. L'identification du rôle direct que peuvent jouer ces traitements dans ces troubles et des mécanismes biologiques impliqués est indispensable pour permettre de guider les cliniciens dans le choix des différentes thérapies à disposition et pour proposer des solutions permettant de réduire ces troubles.

L'un des premiers objectifs de ce projet est d'évaluer et de comparer chez la souris le rôle direct que peuvent avoir deux thérapies du cancer en phase d'étude clinique dans l'apparition de troubles de l'humeur et de déficits d'apprentissage, de mémoire et de flexibilité comportementale, de troubles de prise alimentaire et d'agressivité, d'altérations de l'activité spontanée, des comportements sociaux et compulsifs. Pour cela des souris adultes, non porteuses de cancer, seront utilisées dans différents tests comportementaux. Les effets de deux thérapies différentes (5 doses par thérapie) seront évalués afin de déterminer celle qui, tout en conservant ses propriétés anticancéreuses, aura le moins d'effet secondaire délétère sur les fonctions du système nerveux central. Dans un second temps, en fonction de la mise en évidence d'effets secondaires de ces traitements, les effets d'au maximum 5 agents pharmacologiques, pourraient être testés successivement en combinaison avec les thérapies anti-cancer afin de tenter de compenser ou réduire les effets délétères des thérapies.

Un total de 1219 souris minimum et 2194 souris maximum (option la moins probable) sera utilisé pour l'ensemble du projet. Au total, 6 études seront réalisées (pour les différents tests comportementaux utilisés) avec pour chacune au minimum 15 groupes de 13 souris soit 195 souris par étude et donc 1170 souris au minimum. Si les thérapies ciblées entraînent des modifications délétères sur le plan comportemental, et que le 1er agent pharmacologique choisi ne compense pas ces effets délétères, 4 autres agents au maximum seront testés successivement dans les tests comportementaux où des altérations auront été mises en évidence. Dans ce cas, un maximum de 12 groupes (13 souris par groupe) supplémentaires sera utilisé dans les 6 études, soient 936 souris. Le protocole de l'étude 6 nécessite l'utilisation supplémentaire de 49 souris minimum à 88 souris maximum. Le nombre d'animaux par groupe est fixé à 13 afin de pouvoir réaliser des analyses statistiques pertinentes, tout en tenant compte de décès éventuels ou de mise à mort anticipée. Afin de réduire le nombre total d'animaux, plusieurs procédures comportementales seront réalisées sur les mêmes animaux dans 3 des études. De plus, les animaux nécessaires aux prélèvements d'organes indispensables pour réaliser des études biologiques ultérieures seront ceux qui auront été utilisés lors des analyses comportementales.

L'utilisation de l'animal est indispensable afin de déterminer le rôle direct que peuvent avoir ces traitements dans l'apparition de troubles comportementaux éventuels. De plus, l'animal permet de s'affranchir de facteurs tels que la maladie elle-même ou le stress lié à la pathologie du cancer. Le travail effectué sur les prélèvements biologiques également réalisés chez ces animaux permet de mieux comprendre les mécanismes impliqués. Grâce à l'animal il est également possible de tester les effets d'agents pharmacologiques qui pourraient compenser les effets délétères éventuels des traitements anti-cancéreux.

Les conditions d'hébergement seront conformes aux normes recommandées. Les traitements débuteront après une acclimatation des animaux aux conditions d'hébergement et à la manipulation par l'expérimentateur. Avant chaque test comportemental les souris seront familiarisées à la pièce d'expérimentation pendant 30 min. Durant toute la durée de l'expérimentation, un suivi quotidien des animaux sera réalisé notamment au moment de la pesée/administration des traitements et permettra de déceler un éventuel signe de souffrance. Si un niveau de souffrance intolérable est atteint et une mise à mort anticipée sera réalisée.

8152 L'obésité, actuellement considérée comme une épidémie, touche plus de 1,9 milliards d'adultes dans le monde. Cette pathologie, caractérisée par une surcharge pondérale, est également associée à une

augmentation des lipides dans le sang (cholestérol et triglycérides) et dans le foie et à des anomalies de la régulation de la glycémie. De plus, ces patients présentent des défauts de sécrétion de l'insuline et de sensibilité des organes périphériques à cette hormone.

Parallèlement, un nombre croissant de consommateurs est soucieux de maintenir un bon état de santé et améliore leur hygiène de vie en exerçant une activité physique régulière et en privilégiant une alimentation variée et équilibrée. A ce propos, il a été démontré que les régimes riches en fibres et/ou en protéines exercent des effets positifs sur l'organisme en induisant notamment un signal de satiété qui perdure au-delà du repas. De plus, il a été récemment démontré que ces effets bénéfiques étaient dépendants d'une induction de la production de glucose par l'intestin.

De ce fait, un complément alimentaire enrichi en fibres et en protéines dans une situation d'obésité mais également dans une situation physiologique normale, pourrait permettre une amélioration des paramètres énergétiques et glucidiques.

Dans un premier temps, ce projet vise à tester l'effet d'un complément alimentaire industriel riche en protéines et en fibres sur le métabolisme énergétique au niveau du cerveau et des organes périphériques tels que le foie et le tissu adipeux. Dans un deuxième temps, nous testerons l'hypothèse selon laquelle ce complément augmenterait la production de glucose par l'intestin qui via un signal nerveux dit « glucose portal », active certaines zones du cerveau impliqués dans la régulation de l'équilibre énergétique.

Dans ce projet, nous proposons deux protocoles complémentaires. Dans un premier protocole nous testerons l'effet de la supplémentation dans une situation pathologique telle que l'obésité induite par un régime riche en graisses et en sucres, High Fat High Sucrose.

Dans un second protocole, nous analyserons si la supplémentation améliore l'équilibre énergétique dans un contexte physiologique (le vieillissement). Dans ce protocole, nous réaliserons nos études sur des souris âgées de 6 mois qui commencent à développer de légers défauts métaboliques (résultats du laboratoire), comme chez l'homme au cours du vieillissement. Le but recherché est donc le maintien d'un métabolisme de santé en prévention des effets délétères de vieillissement.

Seront analysés dans les deux protocoles :

1. La prise de poids et la prise alimentaire
2. La composition corporelle (pourcentage de masse grasse et maigre)
3. Les paramètres métaboliques (métabolisme du foie, glycémie, concentration plasmatique en insuline et leptine ...)
4. L'activation des zones cérébrales impliquées dans la régulation de l'équilibre énergétique
5. L'activation de la production de glucose par l'intestin
6. La production d'acides gras à courtes chaînes
7. La composition de la flore intestinale

Le rôle de la production intestinale de glucose dans les effets métaboliques de la supplémentation sera évaluée en comparant les résultats obtenus entre des souris contrôles sauvages (contrôles-C57Bl/6J) et des souris invalidées pour la glucose-6-phosphatase (enzyme clé de la production endogène de glucose) spécifiquement dans l'intestin (souris I.G6pc/-). Ces animaux ne présentent aucun signe de stress, ni de douleur par rapport aux souris contrôles. Toutes les souris seront élevées et hébergées par groupe de 3 par cage en milieu enrichi (coton de nidation, bois à ronger) et contrôlé. Ce projet sera réalisé selon le respect de la règle des 3R :

Par souci de raffinement les procédures sont maîtrisées au sein du laboratoire et la connaissance du modèle animal permet de définir des points limites (hypoglycémie, prostration, ...). Le suivi du bien-être des animaux sera réalisé régulièrement en étudiant leur poids, leur prise alimentaire et leur comportement afin d'identifier tout individu en souffrance. Le nombre total d'animaux, soit 216 souris, a été calculé au plus juste afin de réduire au maximum le nombre de souris utilisées. La nécessité d'avoir recours à des animaux dans ce projet est d'obtenir une réponse de l'organisme tout entier en temps réel, ce qui n'est pas réalisable en modèle cellulaire.

8153 Le MAILPAN (MAcroencapsulation of PANcreatic Islets) est un prototype de pancréas bioartificiel dédié au traitement des patients diabétiques de type 1. C'est un dispositif médical implantable dédié à encapsuler des cellules sécrétrices d'insuline afin de rétablir, de façon physiologique et sans immunosuppresseur, une glycémie normale, chez ces patients.

Afin d'amener ce prototype chez l'homme, il est nécessaire de réaliser des études de faisabilité d'implantation, de sécurité et de fonctionnalité du MAILPAN en phases précliniques, c'est à dire chez l'animal (remplacement).

Dans une première phase de l'évaluation thérapeutique, nous avons déjà étudié (1) la faisabilité d'implantation du MAILPAN (voies d'abord, type d'ancrage-fixation et (2) l'intégration fonctionnelle et histologique du prototype (captation du sucre). Nous n'avons observé aucune complication à l'implantation, le dispositif s'est bien intégré et aucun rejet n'a été constaté.

Ce projet est une nouvelle étape et propose de tester l'implantation ce dispositif de pancréas artificiel chez le rat afin d'évaluer sa fonctionnalité notamment sa perméabilité à l'insuline.

Nous implanterons le pancréas artificiel chez 21 rats wistar sains. L'insuline marquée à l'iode 125 sera injectée dans le dispositif un mois après son implantation et sa délivrance sera évaluée grâce à une imagerie nucléaire permettant de réaliser des clichés suffisamment précis pour voir la distribution de l'insuline dans l'organisme.

Le nombre d'animaux a été réduit au maximum garantissant un nombre suffisant d'individus pour une exploitation statistique des résultats (réduction). Les conditions d'hébergement (enrichissement du milieu : briquettes de bois), de soins et les méthodes utilisées (anesthésie générale, analgésie contrôlée, soins post-opératoires) sont les plus appropriées pour réduire la douleur, le stress ou tout autre dommage intercurrent (raffinement).

Nous avons établi des points limites (complications respiratoires après l'anesthésie, temps de réveil allongé, arrêt de l'alimentation, altération de l'état général, prostration, infection des plaies). Dans ce cas, la douleur ou la détresse de l'animal d'expérimentation seront diminuée grâce à des médicaments spécifiques ou dans les cas extrêmes, l'expérimentation sera arrêtée.

8154 Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI), telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique, sont des maladies complexes et multifactorielles affectant le tractus gastro-intestinal et dont la physiopathologie n'est que partiellement élucidée. Le nombre de patients atteint par ces maladies augmentant, de nombreux traitements ont été mis en place (ex : glucocorticoïdes, immunosuppresseurs). Cependant, ces traitements possèdent d'importants effets secondaires et peuvent aussi se révéler inefficaces chez un grand nombre de patients. D'autres voies thérapeutiques font donc l'objet de recherches.

La cathepsin C est une protéine ayant un rôle dans la maturation des protéases (enzymes impliquées dans les processus inflammatoires). L'effet de l'inhibiteur de la cathepsin C (ICatC) sur les protéases clés dans la réponse inflammatoire, a été validé in vivo chez des primates en tant que modèle pour la polyarthrite rhumatoïde). Le rôle de la cathepsin C a également été mis en évidence dans l'inflammation pulmonaire.

Ce projet a pour but de révéler chez un modèle murin le potentiel anti-inflammatoire d'un inhibiteur de la cathepsin C dans le cadre de maladies inflammatoires chroniques intestinales. En fonction des résultats, de nouveaux médicaments à base de cette molécule pourraient être développés pour traiter les MICI. Le modèle de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des MICI (augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, symptômes cliniques tels que le sang dans les selles...). Ceci explique son utilisation fréquente dans les études sur ces maladies et en particulier au cours de ce projet. Au cours de l'ensemble des procédures, l'ICatC sera quotidiennement administrée par injection sous-cutanée aux souris, soit avant administration du DSS (procédure 1; 60 souris utilisées) soit pendant ou après administration du DSS (procédures 2 et 3; 40 souris utilisées par procédure), pour mettre en évidence un effet anti-inflammatoire, préventif et/ou curatif. Ce qui nous amène à un total de 140 souris pour l'ensemble de ce projet. Pour la procédure 1, six groupes sont nécessaires : un contrôle négatif; un groupe permettant d'évaluer les effets indésirables de cette molécule; un groupe afin de s'assurer que la colite a bien été mise en place et trois groupes permettant

respectivement d'analyser l'effet anti-inflammatoire de l'ICatC lors de l'induction, en prévention et lors de l'entretien de la colite. Pour la procédure 2, 4 groupes permettront de s'assurer de la mise en place de la colite et de tester l'effet anti-inflammatoire de l'ICatC pendant l'induction de la colite et sur la phase de récupération. Enfin, pour la procédure 3 quatre groupes seront mis en place. Un groupe ne recevant ni DSS ni ICatC, un deuxième groupe où la colite sera mise en place sans le traitement par les ICatC, un troisième groupe sans induction de colite mais avec un traitement par l'ICatC et enfin un groupe où la colite sera mise en place et avec un traitement par l'ICatC.

Un suivi clinique journalier des souris sera effectué jusqu'à l'euthanasie de ces dernières. Il en découlera un score clinique permettant de déterminer l'intensité clinique de la pathologie. D'autres analyses effectuées sur le côlon des animaux prélevé après leur euthanasie, ainsi que sur leurs fèces, permettront de quantifier l'inflammation d'un point de vue macroscopique et microscopique. Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner. Remplacer : Utiliser uniquement une approche in vitro ou in silico pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir au sein de l'hôte (hormones, système immunitaire entre autres); de ce fait le recours aux animaux est indispensable.

Réduire : chaque procédure contiendra des groupes de 10 souris où l'inflammation intestinale sera induite par du DSS dans l'eau de boisson. Ce nombre, défini à l'aide d'études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais aussi grâce à un test de puissance, permet d'incorporer un nombre minimum d'animaux tout en obtenant des résultats statistiques significatifs.

Raffiner : Les souris seront hébergées par 5 dans des cages collectives. L'eau et la nourriture seront disponibles à volonté et les paramètres ambiants seront contrôlés régulièrement (température, humidité...). Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels en carton pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper. Les points limites justifiant une euthanasie sont : perte de poids dépassant 20%, et/ou selles liquides accompagnées de présence de plis persistants sur la peau témoignant d'une déshydratation importante, et/ou état de prostration (souris immobile, peu réactive aux sollicitations des congénères ou du manipulateur, dos voûté, yeux fermés, absence de toilettage).

8155 Les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique, sont des maladies complexes et multifactorielles affectant le tractus gastro-intestinal et dont la physiopathologie n'est que partiellement élucidée. Le nombre de patients atteints par ces maladies augmentant, de nombreux traitements ont été mis en place (ex : glucocorticoïdes, immunosuppresseurs). Cependant, ces traitements possèdent d'importants effets secondaires et peuvent aussi se révéler inefficaces chez un grand nombre de patients.

D'autres voies thérapeutiques font donc l'objet de recherches. Il a été montré que l'activité de certaines protéases (enzyme clivant les liaisons peptidiques des protéines) présentes au sein de la muqueuse intestinale augmentait chez les patients et que cette hyperactivité favorisait le maintien de l'inflammation dans la muqueuse. Au vu de ces observations, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases (protéines inhibant spécifiquement les protéases) appelés serpins semble être une approche thérapeutique à exploiter.

Certaines serpins bactériennes ont déjà fait l'objet de recherches et se sont révélées avoir un effet anti-inflammatoire in vitro et in vivo. Lors de tests in vivo, les serpins ont été clonées dans la souche *Lactococcus lactis* (comme la serpin humaine élafin antérieurement). Cette souche est fréquemment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour la production de protéines recombinantes (protéines produites grâce à l'introduction du gène codant pour cette protéine dans une bactérie), pour son faible pouvoir immunogène, et présente une capacité de production intéressante de protéines recombinantes.

Par ailleurs, un autre microorganisme, la levure *Yarrowia lipolytica*, est également utilisé dans l'industrie agroalimentaire et présent dans les aliments fermentés. Cette levure est inoffensive et connue surtout pour son potentiel de sécrétion de protéines.

Le but de l'étude est de tester l'implantation de *Yarrowia lipolytica* chez des souris axéniques (dépourvues de microbiote intestinal, élevées dans des bulles stériles). Ceci permettra de déterminer

si cette levure pourrait être utilisée pour la sécrétion de serpins bactériennes in vivo, en vue du développement de futurs traitements chez l'Homme.

Tester l'implantation de la levure permettra non seulement de s'assurer que la levure s'implante et se développe bien dans le tractus digestif, mais aussi que ce microorganisme ne possède aucun impact physiologique (plus particulièrement au niveau intestinal) ou comportemental sur les animaux.

Un suivi clinique hebdomadaire sera effectué après inoculation de la levure *Y. lipolytica*. Aucune douleur, souffrance ou angoisse n'est attendue dans cette procédure.

Nous inoculerons la levure *Yarrowia lipolytica* à 4 souris C57Bl6/J par gavage orogastrique de 0.2mL d'une culture pure. Nous suivrons pendant 15 jours l'implantation de la levure. Pour cela, nous collecterons de façon hebdomadaire des fèces (3 à 4 crottes) de chaque animal afin de réaliser un dénombrement de colonies de levures. Au bout de 15 jours, les souris seront euthanasiées. L'étude de l'implantation de la levure *Yarrowia lipolytica* dans un environnement intestinal est nécessaire pour vérifier son innocuité d'un point de vue physiologique et l'absence d'impact comportemental chez la souris en vue d'autres tests utilisant ce microorganisme.

8156 La génération de nouveaux modèles de rats génétiquement modifiés par techniques de transgénèse portant une ou plusieurs modifications génétiques est extrêmement importante puisque ces nouvelles lignées peuvent devenir des modèles de choix pour la recherche fondamentale et biomédicale, des modèles de maladies humaines ou de validation de cibles thérapeutiques.

Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse « classique » (additive, aléatoire) portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène exogène. Les lignées transgéniques obtenues par transgénèse ciblée seront quant à elles déficientes pour un gène (KO) ou incorporeront un nouveau gène ou une modification spécifique (KI), toujours dans un endroit déterminé (locus endogène).

Ce projet concerne la génération de nouveaux modèles de rats génétiquement modifiés par techniques de transgénèse pour répondre aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Les techniques de transgénèse sont basées sur la microinjection de divers types de transgènes dans des embryons au stade préimplantatoire (< 4 jours après fertilisation). Pour le modèle rat, les injections des transgènes ont lieu principalement dans des embryons au stade une cellule (E0.5). La microinjection de cellules souches embryonnaires (cellules ES) modifiées dans des embryons au stade blastocyste (E3.5) reste beaucoup plus rare dans cette espèce en comparaison au modèle souris.

La première étape pour faire aboutir un projet de transgénèse consiste à avoir un grand nombre d'embryons à modifier. C'est pourquoi nous utilisons la procédure de superovulation (traitement hormonal des femelles donneuses avec deux hormones avant l'accouplement avec les mâles reproducteurs) afin d'augmenter le nombre d'ovocytes produits naturellement. La superovulation permet donc de réduire le nombre de femelles nécessaires pour la création d'une lignée de rats transgéniques.

Les embryons fertilisés obtenus après superovulation sont ensuite micromanipulés afin de les modifier. Après microinjection, les embryons sont réimplantés moyennant une petite intervention chirurgicale chez des rats femelles receveuses (préparées pour la gestation), qui permettront leur développement à terme. Les rats nés de ces mères-porteuses seront ensuite analysés afin d'identifier les individus qui auront incorporé la modification désirée (transgéniques). Tous les animaux issus de ces embryons génétiquement manipulés seront hétérozygotes pour les modifications génétiques et il est très peu probable que ces animaux présentent un phénotype dommageable. Toutefois, nous surveillerons attentivement le développement des animaux transgéniques pour détecter précocement toute anomalie qui pourrait nécessiter des soins particuliers.

Les techniques de transgénèse nécessitent des animaux, et la nécessité de recourir à ces modèles animaux est justifiée sur les plans scientifique et éthique dans chacun des projets de nos partenaires. Les lignées obtenues ne présentent en principe pas de phénotype dommageable pour l'animal et le niveau de sévérité est léger pour la superovulation des femelles et modéré pour la réimplantation chirurgicale d'embryons. L'optimisation de la procédure de superovulation (horaires/concentration d'hormones) est une préoccupation permanente afin de réduire le nombre de rats nécessaires pour aboutir à la génération d'un nombre de lignées transgéniques adéquat. Le raffinement et le bien-être

animal sont optimisés pour la réussite des réimplantations et l'amélioration de l'efficacité de génération des rats transgéniques. Un traitement antalgique post-opératoire est systématiquement utilisé.

Les procédures expérimentales ont été optimisées pour réduire le nombre d'animaux utilisés et réduire l'impact des gestes sur le bien-être des animaux. Nous aurons en particulier recours à des antalgiques pour réduire l'éventuelle douleur post-opératoire.

Au total, ce projet permettra la création de nouvelles lignées de rat qui seront utiles à la recherche fondamentale et biomédicale. L'activité de transgénèse rat de ce projet conduira, en 5 ans, à la génération de 3-5 lignées pour chacun des projets autorisés (1-3 /an, maximum 2115 rats utilisés).

8157 Le traitement de nombreux cancers reste encore très difficile voire inefficace et les méthodes traditionnelles n'ont pas encore apporté de réponses satisfaisantes sur le long terme. Ainsi, souvent, après plusieurs chimiothérapies qui pour la plupart apportent un bénéfice immédiat, la tumeur va recommencer à croître, avec la sélection de cellules résistantes au traitement et aboutissant à la mort du patient. C'est pourquoi s'est imposée, au sein de la communauté scientifique, l'idée qu'une seule méthode de traitement n'est pas suffisante pour guérir du cancer. Il existe ainsi une demande pressante de la part de l'industrie pharmaceutique pour l'identification de récepteurs spécifiques des cellules tumorales, permettant des approches de ciblage ou vectorisation d'agents d'imagerie et molécules thérapeutiques. Des partenaires de ce projet ont engagé le développement de peptides vecteurs (pVectors) conjugués avec des molécules d'imagerie, soit des fluorochromes (pVectors FI), soit des agents pour l'imagerie avec des radioéléments (pVectors-X). Certains de nos pVectors ont également été conjugués à un cytostatique (pVectors-CS) comme potentiels candidat-médicaments, susceptibles d'induire un blocage de la prolifération tumorale puis une diminution et une élimination de la tumeur. Nous poursuivons donc 2 objectifs scientifiques et technologiques principaux : i) le développement de nouveaux candidats-imagerie afin d'améliorer la détection et le suivi des cancers, ii) amener des candidats-médicaments aux phases précliniques de validation. Les objectifs principaux concernant le 1er point se déclinent en 2 Procédures spécifiques dans notre Demande d'Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques.

Des expériences sont ainsi envisagées chez l'animal (souris) pour les 2 procédures suivantes : 1) Glioblastomes et 2) IRM in vivo de souris porteuses de Glioblastome.

Lors de précédentes études in vitro, nous avons pu démontrer le ciblage spécifique d'une première génération de vecteurs d'imagerie sur différents modèles cellulaires. Dans le présent projet, nous souhaitons utiliser ces mêmes vecteurs et des vecteurs optimisés (peptides différents, linkers différents.) afin d'évaluer le potentiel de ciblage in vivo. Les données recueillies lors de ces précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les protocoles expérimentaux. Nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro. Cette question ne peut être abordée qu'in vivo car il n'est pas possible d'étudier la distribution de nos molécules d'imagerie dans des systèmes in vitro reproduisant la complexité des systèmes in vivo (élimination, stabilité.). Le modèle rongeur est indispensable à notre étude car il facilite le suivi des expérimentations, la gestion de la douleur, la faisabilité d'un groupe et le modèle de choix pour la préclinique. 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. Dès leur arrivée les animaux seront placés en salle d'acclimatation pendant une semaine avant toute expérimentation. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation et adaptées en accord avec le personnel de l'animalerie (les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum; le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification, de tunnels en cartons et des petites maisons y seront disposées, hébergement en groupe et en conservant autant que possible les groupes formés afin de maintenir la stabilité hiérarchique établie). Les animaux seront observés quotidiennement afin de respecter leur bien-être. La mise en place d'une grille de suivi strict des points limites (état général, perte de poids, volume de la tumeur...) permettra d'éviter au maximum le stress et/ou la douleur au cours de l'expérimentation. Des soins pré- et post-opératoires seront effectués lors de chaque expérimentation avec recours à l'anesthésie et analgésie lorsque cela sera nécessaire. Le personnel impliqué dans ce projet assure

également une veille scientifique continue, évitant toute expérimentation déjà rapportée dans la littérature. La Réduction du nombre d'animaux passe par une étude longitudinale qui utilise les mêmes animaux pour l'injection des molécules contrôle/d'intérêt sur les différents temps du protocole (l'animal imagé est son propre témoin).

Le nombre d'animaux nécessaire (120 animaux) pour cette étude « Approche Imagerie », d'une durée totale de 5 ans, a été déterminé grâce à un test statistique appliqué pour chaque expérience, à des données de la littérature, et à des études précédemment réalisées dans le cadre de projet semblables concernant le développement de radiotraceurs pour TEP. Ceci nous a permis de réduire le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour ne pas compromettre la validité des expériences (une moyenne de 24 animaux par an, soit un nombre total et maximal de 120 animaux sur 5 ans). L'ensemble de ces paramètres sera affiné en fonction des premiers résultats obtenus afin d'ajuster au mieux le nombre d'individus nécessaires par étude et si possible réduire cette estimation.

8158 L'accident vasculaire cérébral (AVC) ischémique, c'est à dire l'occlusion d'un vaisseau cérébral par un caillot sanguin, est la 3ème cause de mortalité et la 1ère cause de morbidité des pays industrialisés : 120000 personnes en sont victimes chaque année en France, dont les 3/4 ont plus de 65 ans. Les seuls traitements disponibles à l'heure actuelle sont : le rtPA, ou activateur tissulaire recombinant du plasminogène, qui permet de détruire le caillot sanguin qui obstrue l'artère et la thrombectomie, qui permet de retirer le caillot mécaniquement à l'aide d'un stent. Malheureusement, ces traitements ne sont possibles que lors des 4.5 à 6 premières heures de survenue de l'AVC ce qui limite considérablement leurs utilisations. Il est donc essentiel de développer de nouveaux traitements et pour cela il est nécessaire de se rapprocher de la pathologie humaine en intégrant dans nos études expérimentales les facteurs de risque des AVC. Le diabète est un important facteur de risque vasculaire car il double le risque de survenue des AVC et leur mortalité. De manière alarmante, il est prévu une pandémie de diabète d'ici 2035, et donc de la survenue d'AVC, et la recherche de traitements efficaces est d'autant plus cruciale. L'AVC est responsable d'une cascade d'événements, qui vont eux-mêmes aggraver la lésion cérébrale. Ainsi, le rôle délétère de l'inflammation dans le cerveau est bien connu, en passant par l'activation des cellules microgliales, cellules immunitaires spécifiques du cerveau. Il existe de manière paradoxale une dépression immunitaire en dehors du cerveau qui aurait un rôle dans l'aggravation des lésions. L'acétate de glatiramère (Copaxone) est un médicament employé dans la sclérose en plaques pour son rôle anti-inflammatoire et neuroprotecteur. Ce médicament, ayant déjà obtenu l'AMM chez l'Homme dans la sclérose en plaques, pourrait constituer un traitement novateur dans l'ischémie cérébrale pour contrer cette réponse inflammatoire qui, par la cascade d'événements qu'elle génère, est très délétère et contribue à l'aggravation secondaire des lésions.

Ainsi, dans cette étude nous utiliserons un modèle d'ischémie cérébrale chez des souris diabétiques, traitées ou non par l'acétate de glatiramère.

Les objectifs du projet sont d'étudier l'effet de l'acétate de glatiramère administré chez la souris diabétique, en termes de réduction du volume de l'infarctus cérébral, d'augmentation de la survie neuronale, de la neurogenèse, d'amélioration du déficit neurologique et du déclin cognitif. Nous analyserons dans un second temps les mécanismes impliqués et en particulier la régulation de la réponse inflammatoire post-ischémique par ce traitement chez ces souris diabétiques.

Les différents axes du projet impliquent 304 souris pour l'ensemble des protocoles expérimentaux pour une période de 5 ans. Les groupes ont été conçus de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Une analgésie par buprénorphine (0.1mg/kg en sous-cutané) sera réalisée 30 minutes avant le début de la procédure chirurgicale et renouvelée /12h pendant 48h.

Après la mise à mort des animaux, le sang et les tissus (cerveau, rate, moelle osseuse) sont prélevés et stockés pour les analyses cellulaires (typage des cellules), biochimiques et histologiques.

La demande de ce projet d'expérimentation animale est justifiée par le fait qu'aucune approche in vitro ne permet de rendre compte de la complexité des interactions entre les organes lymphoïdes et le cerveau après ischémie cérébrale au cours du temps. Ce modèle d'AVC n'est pas remplaçable.

8159 L'émergence de nouvelles pathologies virales reste encore aujourd'hui un enjeu majeur de santé publique comme l'ont montré ces dernières années les épidémies causées par les virus Ebola et Zika. Notre capacité à protéger les populations contre ces pathogènes est un défi permanent. Les vaccins sont un des piliers de la lutte contre les infections virales. Les vaccins vivants atténués ont beaucoup d'avantages. Cependant, de nouvelles approches devront être développées dans le futur pour améliorer leur sécurité. Ce projet, à visée fondamentale mais également appliquée et d'une durée de deux ans maximum, propose de développer une approche générique pour la création et la production de vaccins vivants atténués de nouvelle génération contre les virus à génome ARN. Les flavivirus transmis par les tiques seront utilisés comme modèles (AHFV=virus de la fièvre hémorragique Alkhurma ; OHFV=virus de la fièvre hémorragique Omsk). Plusieurs méthodes moléculaires d'atténuation seront expérimentées seules ou combinées : Le réencodage des codons à grande échelle (introduction d'un grand nombre de mutations synonymes faiblement délétères dans les régions codantes), l'échange de gènes codant pour des protéines virales hétérologues (souches chimériques) ainsi que l'introduction de mutations d'atténuation non synonymes ou localisées dans les régions non codantes.

Retombées scientifiques attendues :

Plusieurs candidats vaccins protégeant contre les flavivirus transmis par les tiques seront produits. Ces expériences permettront d'évaluer le degré de protection croisée de ces souches virales atténuées vis à vis de deux virus hautement pathogènes chez l'homme, AHFV et OHFV. En effet, les résultats obtenus permettront de mesurer le degré d'atténuation, la production d'anticorps neutralisants induite après vaccination ainsi que le niveau de protection contre une réinfection par un virus sauvage (AHFV et OHFV).

Durée du projet :

Ce projet sera d'une durée maximale de deux ans.

Espèce et nombre d'animaux utilisés :

Au total, 196 souris seront utilisées au cours de 2 procédures.

Effets néfastes attendus sur les animaux, degré prévu de sévérité, et sort final des animaux :

Les virus étudiés étant hautement pathogènes chez l'homme, les modèles utilisés induiront donc une infection sévère chez les rongeurs afin de reproduire au mieux la pathologie humaine que l'on souhaite prévenir. Les symptômes spécifiques attendus sont des signes généraux d'infection ainsi que des signes d'atteinte neurologique. Les deux procédures ont donc été jugées sévères. Au cours de la première procédure, les animaux subiront une infection (injection de virus en intrapéritonéal (IP)) et un prélèvement de sang au sinus rétro orbital (SRO). Au cours de la seconde procédure, les animaux subiront en plus l'injection du vaccin en IP. L'ensemble des animaux survivants sera mis à mort à la fin des procédures expérimentales.

Application des 3 Rs

L'étude de l'atténuation virale rend par nature indispensable le recours à l'animal vivant. Aucune méthode alternative ne peut le remplacer. Cependant, et afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à ce projet, le phénotype des virus produits est d'abord étudié de manière poussée in vitro ce qui permettra de réduire le nombre de souches virales testées : seulement 3 candidats vaccins seront étudiés in vivo. Nous travaillerons avec des lots de 8 animaux. Ce nombre a été ramené au minimum nécessaire pour assurer la validité des résultats.

Nous serons vigilants en ce qui concerne les signes de maladie et d'inconfort des animaux testés et les animaux seront pris en charge par du personnel formé et expérimenté. Un score expérimental a été mis en place et sera ajusté pour la seconde procédure. Il permettra de définir des points limites adaptés et suffisamment précoces pour réduire au minimum la douleur et la souffrance des animaux. L'ensemble des gestes techniques sera pratiqué sous anesthésie à l'isoflurane. Afin de diminuer la douleur engendrée par le prélèvement de sang au SRO, une goutte de tétracaïne sera déposée sur l'œil au préalable.

Les animaux seront hébergés en portoirs ventilés, avec pour enrichissement une cabane en carton et des carrés de cellulose.

8160 L'objectif de notre projet est d'évaluer l'effet de deux ingrédients administrés par voie orale à deux doses sur la glycémie postprandiale de souris diabétiques afin de développer un produit alimentaire destiné aux diabétiques de type 2.

Le diabète correspond à une élévation prolongée de la concentration de glucose dans le sang (hyperglycémie). Dans le cas du diabète de type 2 (90% des cas de diabète), ce phénomène provoqué par une perturbation du métabolisme glucidique apparaît progressivement et insidieusement.

En France, en 2015, 3,7 millions de personnes prenaient un traitement médicamenteux pour leur diabète (soit 5,4% de la population). A cela, s'ajoutent les personnes diabétiques qui s'ignorent. Cette prévalence ne cesse d'augmenter en France, particulièrement chez les hommes, les jeunes (<20 ans) et les plus âgés (>80 ans). Les industriels cherchent donc des molécules et ingrédients pouvant agir sur la limitation du passage dans le sang des sucres ingérés lors des repas.

Deux ingrédients dont les études de toxicité ont montré leur innocuité ont été retenus pour être tout d'abord testés chez l'animal.

Pour réaliser ce projet, 60 souris mâles diabétiques (db/db) âgées de 6 à 8 semaines sont nécessaires. Elles seront nourries pendant toute l'étude avec un régime spécial pour entretenir leur pathologie.

Les 60 souris seront réparties en 6 groupes de 10 animaux chacun et elles seront traitées par gavage soit avec de l'eau de source, le véhicule de mise en solution des 2 ingrédients testés ou les 2 ingrédients testés à 2 doses différentes.

Les animaux seront placés à 2 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) dans une animalerie climatisée, à une température de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ et une humidité relative de $50 \pm 20\%$, et ils seront soumis à un cycle lumière-obscurité inversé de 12 heures (lumière de 20h00 à 08h00) afin d'observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton Cell Best SP seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement). Ils auront accès à un régime spécial pour entretenir leur pathologie et de l'eau fournis ad libitum. Les expérimentations débuteront après une période d'acclimatation de 7 jours.

Afin de répartir de façon homogène les animaux dans les différents groupes selon leur glycémie basale, une première mesure de glycémie à jeun sera réalisée une semaine après leur réception et une semaine avant le premier traitement oral. Pour cela, les animaux seront mis à jeun la veille en fin de journée et la mesure sera réalisée le lendemain matin à l'aide d'un lecteur de glycémie par un prélèvement d'une microgoutte de sang à l'extrémité de la queue.

La veille du premier traitement, les animaux seront mis à jeun en fin de journée. Le lendemain matin, le traitement oral sera réalisé puis l'aliment sera mis à disposition des animaux et leur glycémie postprandiale sera mesurée 30 minutes après. Les traitements oraux seront ensuite quotidiens pendant deux semaines et la glycémie sera mesurée selon le même mode opératoire une fois par semaine.

4 mesures de glycémie seront effectuées sur l'ensemble des animaux et les traitements oraux seront effectués pendant 14 jours consécutifs.

Les ingrédients à administrer aux deux doses seront préparés chaque jour de traitement dans une solution de saccharose.

Après la dernière mesure de glycémie, les animaux seront mis à mort par injection d'une surdose d'anesthésique.

Les animaux seront observés quotidiennement et pesés régulièrement tout au long de l'expérimentation, et si une forte perte de poids (>20%) ou des modifications du comportement des animaux sont observés (agressivité, cachexie, vocalises...), ceux-ci seront mis à mort dans des conditions éthiques.

Ce projet est réalisé sur des animaux vivants car il n'est pas possible d'utiliser des modèles in vitro (remplacement) mais nous utiliserons le nombre d'animaux minimum nécessaire et suffisant pour obtenir des résultats représentatifs, reproductibles et significatifs (réduction).

8161 Avec 50 millions de personnes touchées dans le monde, et 50 nouveaux cas pour 100000 habitants et par an dans les pays développés, l'épilepsie constitue le syndrome neurologique le plus répandu dans le monde. En France, elle affecte 600000 personnes environ, et plus de la moitié des nouveaux cas par an sont des enfants ou jeunes de moins de 20 ans. Quand la cause n'est pas d'origine génétique, l'épilepsie est alors souvent la conséquence d'une agression cérébrale sévère qui conduit à une restructuration cérébrale. Quand les régions cérébrales affectées sont l'hippocampe et l'amygdale, des structures du cerveau impliquées respectivement dans les processus de mémoire et de contrôle des états émotionnels, l'épilepsie est alors accompagnée d'un large éventail de déficits neuropsychologiques tels que l'anxiété et les troubles de la mémoire et de l'apprentissage.

Il est donc primordial de développer des stratégies permettant d'enrayer, ou à défaut de diminuer, les déficits cognitifs et affectifs associés à l'épilepsie.

Parmi les stratégies pharmacologiques prometteuses, notre équipe explore les propriétés d'une plante surtout connue pour les propriétés psychotropes de certains de ses composés : le chanvre. Le THC est la molécule extraite du chanvre la plus connue, utilisée dans le cadre d'activités récréatives et présentant des propriétés hautement addictives. En revanche, d'autres composés n'ont aucun effet addictif, et parmi ceux-là, le cannabidiol a montré des effets intéressants dans le traitement des crises épileptiques et des troubles associés dans le syndrome de Dravet, qui est une forme génétique de syndrome épileptique. Notre projet a pour but d'explorer l'effet d'extraits non-psychotropes, donc non-addictifs, sur la prévention et la correction d'une part des déficits de la mémoire et de l'apprentissage, et d'autre part des troubles de l'anxiété, dans un modèle d'épilepsie acquise au cours de l'enfance. Dans ce modèle, l'épilepsie est induite par un agent pharmacologique, la pilocarpine, administrée par voie intra-péritonéale chez des rats mâles de la souche Sprague-Dawley âgés de 21 jours, la récurrence des crises épileptiques spontanées apparaissant 4 semaines plus tard. L'âge de 21 jours est celui du sevrage et il correspondrait, chez l'humain, à la période de la jeune enfance. Ce modèle est choisi car les manifestations comportementales pendant la crise, les dommages cérébraux et les conséquences à long terme présentent des similitudes avec la pathologie humaine. Cette étude sera réalisée principalement par une approche électrophysiologique *in vitro* (patch-clamp sur tranches fraîches d'hippocampe de rat), associée à une approche comportementale (mesure par vidéo et enregistrements électro-encéphalographiques du nombre de crises et évaluation de l'anxiété et des capacités d'apprentissage et de mémorisation).

Dans sa conception, le projet a pris en compte la règle des 3R :

Remplacement : cette étude requiert un modèle préclinique chez l'animal car il n'existe pas de modèle non-animal ou de modèle *in vitro* d'épileptogénèse (transformation d'un cerveau normal en un cerveau épileptique).

De plus, l'analyse de comportements complexes, comme ceux de l'anxiété et de l'apprentissage spatial, et de surcroît la manifestation de crises épileptiques ne peuvent être appréhendées au niveau préclinique autrement qu'*in vivo* chez des mammifères et ne peuvent aujourd'hui être remplacées par des méthodes alternatives *in vitro* ou *in silico*.

Réduction : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 355 rats sur une durée de 5 ans. Ce nombre d'animaux a été réduit au minimum mais à un niveau suffisant pour ne pas compromettre l'atteinte des objectifs de l'étude. Il a été déterminé à l'aide d'outils statistiques, en tenant compte des résultats d'études antérieures dans le laboratoire sur ce même modèle. Enfin, les animaux employés pour évaluer l'anxiété seront « réutilisés » pour examiner l'apprentissage spatial et réaliser les enregistrements électro-encéphalographiques.

Raffinement : les conditions de stabulation sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau *ad libitum*. Les rats mâles arrivent avec une mère adoptive une semaine avant le début de l'expérimentation, et sont donc tous soumis à une période d'acclimatation d'une semaine. Toutes les cages sont enrichies avec de la laine de peuplier. Enfin, nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de limiter au maximum le stress et la douleur chez l'animal, afin de garantir son bien-être grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés. Ceci est particulièrement vrai chez les rats ayant reçu la pilocarpine pour induire l'épilepsie. En effet, l'administration de pilocarpine induit des crises très rapprochées qui deviennent létales si du diazépam n'est pas administré 30 min après. S'en suit une période d'observation de 6 heures, durant lesquelles les rats vont progressivement se réveiller sur un tapis maintenu à 37°C. Quand ils sont tous

réveillés, ils sont pesés puis remis avec leur mère nourricière pendant 2 jours. Ils ne sont maintenus dans l'étude qu'à partir du moment où ils ont repris du poids par rapport au moment de remise avec la mère. Ils sont massés quotidiennement pendant la première semaine de séparation de la mère afin de s'assurer une bonne reprise du transit intestinal, qui pourrait avoir été interrompu par l'administration de pilocarpine. Jusqu'à la fin de l'étude, ils sont maintenus par groupe de 5 et sont pesés 2 fois par semaine pour vérifier leur état général.

8162 L'importance de l'infarctus du myocarde et ses conséquences en termes d'insuffisance cardiaque et de mortalité cardio-vasculaire en font un problème de santé publique majeur dans les pays développés.

La taille de l'infarctus est le facteur majeur du pronostic après infarctus du myocarde aigu. Les interventions visant à réduire la taille finale de l'infarctus ont donc un intérêt clinique majeur pour améliorer le pronostic des patients pris en charge pour infarctus du myocarde. La prise en charge actuelle de l'infarctus du myocarde vise à reperfuser le myocarde le plus rapidement possible, par angioplastie coronaire percutanée primaire le plus souvent. Cependant des études expérimentales et cliniques ont montré qu'une reperfusion brutale avait aussi des effets délétères sur le myocarde ischémique et induisait des lésions de reperfusion supplémentaires. Ces dommages survenant après reperfusion peuvent participer jusqu'à 40% de la taille finale de l'infarctus.

La nouvelle frontière dans la prise en charge de l'infarctus du myocarde aigu s'est déplacée du rétablissement rapide d'une reperfusion efficace de l'artère occluse, à la protection efficace du myocarde à risque de développer un infarctus dans le territoire en aval de l'occlusion. L'objectif est toujours de réduire la quantité finale de myocarde détruit de façon irréversible. Plusieurs études cliniques de phase II ont été réalisées afin de tester différentes interventions de cardioprotection pharmacologique pour réduire la taille de l'infarctus. Certaines ont montré une efficacité, cependant aucune étude de phase III n'a démontré leur applicabilité à la prise en charge thérapeutique de routine des patients présentant un infarctus du myocarde aigu. La recherche de nouvelles voies thérapeutiques pour traiter efficacement cet infarctus de reperfusion est donc un enjeu majeur.

Des études préliminaires sur des modèles cellulaires, ont permis de valider l'effet potentiellement protecteur des ultra-sons. Toutefois, ces résultats, bien que très encourageant, sont très éloignés de la réalité clinique où les ultra-sons doivent prouver leur efficacité en application directe sur l'organe. L'objectif étant une application humaine de cette technologie, seul un modèle comme celui décrit ici, permettra d'avancer sur cette problématique.

Dans ce contexte, l'objectif du projet de recherche, d'une durée de 2 ans, est de valider deux nouvelles stratégies thérapeutiques de protection du myocarde, dites de sono-cardioprotection, sur un modèle d'infarctus réalisé chez le Porc, étape cruciale et préalable à toute étude clinique ultérieure. Deux modes d'applications des ultrasons comme stratégie thérapeutique non-invasive seront testées : la mécano-transduction (Shock-Wave) et les ultrasons focalisés de basses intensités (LIPUS). Toutes deux ont été utilisées pour déposer de l'énergie ultrasonore à différentes intensités dans des endroits focalisés des tissus, avec des utilisations en routine clinique dans le domaine de l'oncologie et en urologie.

Cette expérimentation se fera en plusieurs étapes :

- Etape 1 Etude pilote : Application intra-thoracique (Thorax ouvert) sur le Porc anesthésié (n = 20)
- Etape 2 : Etude effective : Application intra-thoracique (Thorax ouvert) sur le Porc anesthésié (n = 20)
- Etape 3 : Application extra-thoracique (Thorax fermé) sur le Porc anesthésié (n = 30)

Cette expérimentation nécessitera un maximum de 70 porcs anesthésiés sans réveil de l'animal. Une prise en charge de la douleur due à la chirurgie est prévue. Les techniques de protection utilisées sont sans douleurs associées.

Après expérimentation, les porcs seront euthanasiés en conformité avec les procédures autorisées, et plusieurs équipes pourront utiliser du matériel biologique par prélèvement, pour une application de la règle des 3R (prélèvement des reins pour tests de conservation des organes ; prélèvement de peau par une équipe de dermatologie ; prélèvement de muscle pour tests bioénergétiques).

8163 Les lésions du ligament croisé antérieur (LCA) est une affection fréquente avec une incidence évaluée à 1/3000. Cette affection évolue vers l'arthrose du genou avec des conséquences sur l'activité physique et professionnelle et font d'elle un enjeu de santé publique.

De par la faible capacité de cicatrisation du ligament, la prise en charge de cette pathologie s'est très vite orientée vers une reconstruction chirurgicale. Dans les années 1900, des techniques de suture directe de ce ligament ont été réalisées avec un taux d'échec très élevé. Une approche plus récente consiste à une ligamentoplastie de genou avec un tendon régional. Cette technique est devenue une procédure standardisée classiques de l'orthopédie pouvant être réalisé en ambulatoire avec de bons résultats fonctionnels dans 80% des cas. Il persiste cependant un taux de rupture entre 3 et 19% des cas. Les récurrences de lésions du LCA après chirurgie sont souvent dues à des problèmes techniques (problème de position ou de fixation du greffon, mauvaise qualité du greffon...) mais s'expliquent aussi par un défaut d'intégration biologique du greffon tendineux dans l'os.

Durant les dernières années de très nombreuses études ont essayé d'améliorer biologiquement cette intégration et de renforcer cette interface os-tendon. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été utilisés dans diverses applications orthopédiques afin d'améliorer la cicatrisation des tissus et la consolidation osseuse.

L'objectif de ce projet est d'analyser l'influence de l'adjonction de CSM dans le phénomène d'ostéointégration d'un ligament artificiel dans la technique de ligamentoplastie de genou sur un modèle de lapines New-Zealand White. Cette étude portera à la fois sur une analyse histologique du greffon et de son intégration, d'une analyse d'imagerie avec l'adjonction de nanoparticules ferriques permettant leur suivi en IRM et d'une analyse biomécanique en testant les résistances de ces greffons par rapport à un modèle standard.

Cette expérimentation sera réalisée sur 40 lapines NZW dans cette première phase comportant 2 groupes de 20 animaux : autogreffe de tendon, ligament artificiel avec un délai de cicatrisation de 3, 6 et 12 semaines. Une seconde étape de cette étude aura lieu ultérieurement avec de 2 groupes de lapines opérés avec un ligament associé à des cellules souches mésenchymateuses. La chirurgie sera réalisée sous anesthésie générale avec gestion de l'analgésie post-opératoire. L'expérimentation sera conduite dans le respect des règles éthiques des 3R. Le remplacement n'est pas possible car il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour évaluer une reconstruction du ligament. La réduction du nombre d'animaux par groupe tient compte d'un test de puissance statistique avec $n=6$ /groupe, correspondant à 6 x 4 groupes x 3 délais, soit 72 lapins et 8 animaux de secours. Les animaux seront hébergés en cage individuelle en post-opératoire immédiat (avec un contact visuel et olfactifs avec les autres lapins) puis par 3 pour diminuer le stress post-chirurgical des animaux avec un contrôle journalier de la prise alimentaire (celle-ci étant surveillée par la pesée des aliments), signes de prostration (raffinement). Cette saisine réalisée correspond à la phase 1 de notre étude qui étudie l'autogreffe tendineuse et le ligament artificiel

8164 La mucoviscidose est une maladie héréditaire mono-génique autosomique récessive grave affectant chaque année un nouveau-né sur 4200 en France. Nos travaux de recherche visent à mettre au point un traitement curatif pour cette maladie. Nous voulons ici évaluer l'efficacité de transfert de gènes in vivo de formulations, issues de nos recherches, et préalablement testées de façon approfondie en conditions in vitro. Nos investigations nous ont conduites à sélectionner 4 formulations lesquelles représentent des candidates parmi les plus intéressantes à tester à l'heure actuelle. Dans le cas présent, les molécules testées correspondent à des lipides cationiques originaux et les cellules cibles sont les cellules épithéliales bronchiques. Ceci implique d'effectuer des tests en conditions in vivo afin de prendre en compte toutes les contraintes liées à la complexité des voies respiratoires pulmonaires lesquelles ne peuvent être reproduites en conditions in vitro. La méthode d'administration utilisée consiste à délivrer les formulations à tester sous la forme d'un aérosol pouvant être respiré. Les molécules testées peuvent ainsi interagir directement avec l'épithélium des voies respiratoires, en particulier avec les cellules cibles à traiter. L'espèce animale de référence pour ce type d'étude est la souris. Les souris qui seront utilisées ici sont invalidées au niveau du gène CFTR ; de ce fait, elles représentent un modèle pertinent pour étudier l'efficacité du transfert de gène CFTR. En pratique, les animaux sont introduits pendant 30 à 45 minutes dans une chambre d'exposition où ils peuvent se déplacer sans contrainte. Ils y respirent un aérosol formé à partir des agents de transfert de gènes

à tester. De suite après cette exposition, les animaux sont replacés dans leur cage puis stabulés normalement, sans autre traitement, jusqu'à la fin du protocole (soit au plus tard 28 jours après l'exposition). L'évaluation de l'efficacité du transfert de gènes est effectuée en point final, c'est-à-dire sur des prélèvements effectués uniquement immédiatement après l'euthanasie des animaux. L'administration par aérosol est une stratégie adaptée pour un traitement de maladies telle que la mucoviscidose ; elle pourrait être rapidement transposée à la clinique. Par ailleurs, le protocole utilisé est non-invasif c'est-à-dire qu'aucun geste n'est pratiqué sur les animaux, lesquels restent vigiles tout au long de l'expérience (depuis leur réception jusqu'à leur euthanasie en fin de protocole). Enfin, la procédure ne génère pas ou peu de stress chez le sujet, ce qui impacte positivement la qualité des résultats obtenus en réduisant en particulier la variabilité liée à l'administration et donc le nombre d'animaux qu'il est nécessaire d'inclure, en bon accord avec la règle des 3R. Le nombre total d'animaux nécessaires pour la réalisation de ce protocole est de 65 (4 formulations à tester * 5 animaux par temps * 3 temps + 5 animaux « témoins »). Ce nombre est réduit à son minimum sans compromettre les objectifs du projet. Un test statistique non paramétrique sera utilisé afin de comparer les efficacités des différentes formulations testées.

Un screening préalable réalisé in vitro permet de réduire de façon non négligeable le nombre d'animaux inclus dans l'expérience puisque seules les formulations les plus prometteuses seront testées in vivo. Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro et l'éventuelle application clinique.

Le bien-être des animaux sera primordial durant ce projet. Le raffinement du protocole sera assuré notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement, une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

8165 Les Xénopes (*X.laevis* et *X. tropicalis*) sont des grenouilles qui pondent plusieurs centaines d'ovocytes qui, après fécondation, donneront en 5-7 jours des larves nageantes. Ces œufs ont un développement externe se déroulant très rapidement ce qui permet de suivre les différentes étapes du développement et de la mise en place des organes sur une période de quelques jours. Afin de déterminer quel est le rôle de certains gènes lors du développement nous utilisons des approches consistant à inactiver (par diverses approches) les gènes d'intérêts puis à suivre le développement embryonnaire afin de déterminer quelles sont les étapes du développement nécessitant ces gènes.

En pratique ces expériences consistent à injecter dans les œufs justes fécondés des molécules bloquant spécifiquement le gène étudié. Le développement est alors suivi avec attention et les défauts de développement sont caractérisés par des analyses moléculaires. Les œufs sont obtenus par fécondation in vitro à partir d'un lysat testiculaire et des pontes d'ovocytes.

Le développement des larves est stoppé avant que celles-ci ne se nourrissent. Ces larves ne rentrent donc pas dans le calcul du nombre d'animaux utilisé à des fins expérimentales. Les animaux adultes eux rentrent dans ce calcul. Les males sont euthanasiés pour la collecte des testicules tandis que les femelles sont induites à pondre environ tous les 2-3 mois et sont donc utilisés de façon pérenne.

Le projet de recherche présenté ici nécessite sur une période de 5 ans l'utilisation d'environ 325 animaux (150 males (*X.laevis* et *X.tropicalis*) et de 175 femelles (*X. laevis* et *X. tropicalis*)).

La règle des 3R (Remplacement/Réduction/Raffinement) est appliquée en :

Remplacement :

Les méthodes et protocoles que nous avons mis en place permettent la réalisation d'expérience in vivo nécessaire à l'étude des phénomènes de développement embryonnaire vertébrés mais sont réalisées sur des stades larvaires. Certaines expériences purement biochimiques sont réalisées en culture de cellules.

Réduction :

a) mutualisation de l'utilisation des males afin de réaliser plusieurs expériences à partir d'une même fécondation in vitro.

b) Optimisation d'une méthode de conservation des testicules afin de permettre leur utilisation sur une à deux semaines et donc de plusieurs FIV à partir d'un seul male.

c) Les femelles ont une espérance de vie de l'ordre de 10 ans et sont réutilisées tout au long de leur vie.

d) Le travail expérimental nécessitant un nombre d'échantillon important pour l'analyse statistique est réalisé uniquement sur des stades larvaires.

Raffinement :

Les caractéristiques physico-chimiques des aquariums sont contrôlées (température, salinité, pH) ainsi que les conditions d'éclairage. Le milieu est enrichi par l'adjonction d'artefact permettant aux animaux de se dissimuler. Les espaces d'élevages sont séparés des espaces de manipulation et sont des espaces sans bruit ni circulation parasite.

Notre approche expérimentale limite la manipulation des animaux à 1 euthanasie pour les males.

Les femelles, sont induite à pondre par l'injection d'HCG dans la partie supérieure dorsale de la cuisse. Les femelles sont isolées en bacs individuel lors de cette période qui s'étend au maximum sur 48 heures.

8166 Les études en Master de notre Université offre aux étudiants la possibilité d'acquérir des connaissances théoriques et pratiques dans le domaine de la biologie santé et une expertise pratique dans divers domaines, tels que la biologie cellulaire et moléculaire, la génétique et la neurobiologie.

Les travaux pratiques proposés dans une des unités d'enseignement visent à travailler sur des cerveaux de souris modèles de la maladie de Parkinson. Au travers de ces travaux pratiques, les étudiants auront l'opportunité d'évaluer les atteintes cérébrales induites par l'administration de méthamphétamine, qui sont comparables à celles observées dans la maladie de Parkinson. Ce projet vise à produire des souris modélisant la maladie de Parkinson par une injection unique d'une forte dose de méthamphétamine. L'injection et le sacrifice des animaux seront réalisés par l'enseignant en amont des séances de TP. Les étudiants procéderont à la dissection des cerveaux en structures fines et à l'analyse des modifications induites par la méthamphétamine.

Grâce à ces expériences, les étudiants acquerront des compétences techniques et théoriques de base en neurobiologie : neuroanatomie, dissection de tissu cérébral, extraction de protéines et de neurotransmetteurs, étude d'une pathologie neurodégénérative. Grâce à ces expériences, ils évalueront par ailleurs les dommages induits par la méthamphétamine dans le cerveau. Lors de ces travaux pratiques, nous sensibilisons les étudiants non seulement aux questions éthiques soulevées par l'expérimentation animale, mais également aux méfaits de l'usage de stupéfiants, qui entraîne des dommages cérébraux. Le nombre d'animaux utilisés chaque année (10 animaux contrôles et 10 animaux injectés) permettra également de réaliser une analyse statistique des résultats obtenus.

Dans ce projet, nous avons pris en considération la règle des 3Rs (remplacer, réduire et raffiner). Ce type d'études visant à comprendre les bases d'une maladie comme la maladie de Parkinson ne peut être menée que sur un animal vivant (remplacer). Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, deux souris (une souris traitées à la méthamphétamine et une souris traitées avec une solution saline) seront utilisées par groupes d'étudiants. Compte-tenu du nombre d'étudiants dans la formation (20 à 40 étudiants par an, soit 2 groupes de TP), pour réaliser ces travaux pratiques, nous utiliserons 20 souris maximum par an soit 80 souris maximum pour la totalité du projet (4 ans). Nous avons cherché à réduire le nombre d'animaux à son minimum, ce qui justifie que nous n'ayons pas utilisé d'approche statistique pour calculer ce nombre d'animaux. En effet, le but du TP est de donner l'opportunité aux étudiants de réaliser ce type d'expériences, sans nécessairement chercher à reproduire de façon significative les résultats publiés. Pour ce qui concerne le raffinement, après l'injection de méthamphétamine et jusqu'à leur mise à mort, les animaux seront surveillés afin de repérer d'éventuels signes de douleurs et seront soulagés avec des antidouleurs si besoin.

8167 Il est établi que le blocage du récepteur minéralocorticoïde MR par un antagoniste (MRA, Mineralocorticoid Receptor Antagonist) limite la morbidité et la mortalité dans les maladies cardiovasculaires (insuffisance cardiaque, post-infarctus), ainsi que dans d'autres défaillances d'organes en phase terminale.

Le but de ce projet est d'étudier le potentiel thérapeutique d'un antagoniste du MR au cours du processus d'ischémie-reperfusion (IR).

Les données préliminaires obtenues par les partenaires de ce projet indiquent effectivement que le blocage pharmacologique du MR par MRA est bénéfique et prévient les lésions rénales, en particulier après une séquence d'ischémie reperfusion rénale in situ (clampage/déclampage du pédicule).

Dans le contexte de la préservation-transplantation, nous souhaitons caractériser l'influence de la Soludactone (Canrénoate de K, un MRA) sur un modèle porcin de donneur dit à cœur arrêté (modèle DCD). La proximité anatomique (rein de type multilobé et multipapillaire), physiologique, et métabolique avec l'Homme fait du modèle porcin Large White un modèle de référence présentant les avantages suivants :

i) Possibilité de modéliser des situations cliniques humaines en termes « médicaux » réalistes (anesthésie, chirurgie, etc.), en corollaire, l'intérêt suscité par ce modèle auprès des praticiens/chirurgiens expérimentés assure une utilisation éthique et optimale des animaux (diminution des pertes et diminution des demandes en animaux) =>3 R (Réduction).

ii) Le modèle de préservation/transplantation rénale chez le Porc est un modèle préclinique mature, mis au point et utilisé dans notre laboratoire depuis plusieurs années, ce qui limite considérablement la perte d'animaux pré- et post-intervention chirurgicale (3R : Réduction).

iii) En parallèle une prise en charge des animaux est réalisée avec un suivi pré- et post-opératoire (prises de sang, mise en cages métaboliques individuelles situées dans un local maintenu à T°C ambiante, mise à disposition d'eau et de nourriture) et application médicamenteuse si nécessaire afin de diminuer au maximum la douleur (/mal-être) associé(e)s (administration d'anesthésiques-analgésiques) => 3R Raffinement

iv) Le contexte de transplantation n'est modélisable que sur un organisme vivant par conséquent 3R Remplacement ne peut pas s'appliquer dans notre projet.

Ce projet se déroulera en deux volets (effectif total : $n = 12 + 24 = 36$) :

i) Un volet ex vivo (effectif : $n = 12$) : Reins porcins ayant subi une ischémie chaude de 60 min (mimant le modèle DCD) puis conservés en machine à froid (4°C) pendant 20h dans une solution de préservation UW +/- Soludactone.

ii) Un volet in vivo (effectif : $n = 24$) : Utilisant la Soludactone à différentes étapes du protocole expérimental : Reins porcins ayant subi une ischémie chaude de 60 min (mimant le modèle DCD) puis conservés en machine à froid (4°C) pendant 20h dans une solution de préservation UW +/- Soludactone, suivie d'une auto-transplantation (avec néphrectomie contra latérale), +/- Soludactone (injectée 1h avant, puis 48 et 72h après la greffe). Les animaux seront suivis pendant 3 mois post-greffe.

L'ensemble de ces étapes expérimentales précliniques devront fournir les voies mécanistiques induites par l'activation du MR, ainsi que les effets bénéfiques de la Soludactone dans ce modèle. La valeur ajoutée de ce projet est donc une application potentiellement rapide chez l'Homme.

8168 Notre objectif est de développer une forme de pansement osseux qui permettrait l'accélération de la réparation osseuse après fracture ou perte de substance osseuse de petit volume. Les retards, ou les défauts de cicatrisation osseuse chez l'Homme sont fréquents et peuvent toucher à la fois des os longs et porteurs comme le tibia mais aussi des os de petite taille comme les os de la main, tel que l'os scaphoïde. Dans tous les cas ces pathologies sont invalidantes car douloureuses et retardent la reprise d'une activité normale. Le concept de pansement osseux, apposé sur la zone de fracture ou la perte de substance et libérant localement des molécules favorisant la régénération osseuse, serait une stratégie thérapeutique prometteuse car simple, facile à apposer sur la surface osseuse, et évitant l'administration de drogues par voie générale.

Ce programme a pour but de tester 2 pansements osseux qui seront apposés au contact d'une petite perte de substance osseuse au niveau du fémur chez le rat : 1) le premier pansement (C/HA) sera constitué d'un tissu de carbone recouvert d'une couche mince d'hydroxyapatite (HA) qui mime la nature chimique minérale de l'os ; 2) le second pansement sera en plus enrichi en strontium (C/HA/SR), agent connu et déjà utilisé pour favoriser la régénération osseuse. Les expériences de

biocompatibilité et de toxicité que nous avons menées en amont in vitro en présence de cellules osseuses (ostéoblastes humains primaires) ont montré que ces deux types de pansement étaient parfaitement biocompatibles.

Nous souhaitons constituer 3 groupes de 8 rats, soit 24 rats et tester ces biomatériaux dans un modèle de petite perte de substance osseuse créée au niveau des 2 fémurs de chaque animal. Tous les rats subiront une anesthésie générale et une analgésie pré- et post-opératoire. Après incision de la peau et séparation délicate des masses musculaires nous pratiquerons un défaut osseux cavitaire de 3 mm au niveau de l'extrémité inférieure de chaque fémur à l'aide d'une fraiseuse semblable à celles que l'on utilise en chirurgie dentaire. Dans le premier groupe le défaut osseux ne recevra pas de pansement et cicatrisera spontanément, dans les 2 autres groupes nous apposerons un pansement autour de l'extrémité inférieure du fémur en regard du défaut osseux. En fin d'expériences i.e. après 21 jours, l'efficacité des biomatériaux pour la régénération osseuse sera quantifiée par micro scanner et histologie. Les animaux seront sacrifiés et nous comparerons la réparation osseuse dans ces trois groupes. Nous testerons l'hypothèse selon laquelle le comblement du défaut osseux est plus rapide en présence de pansement. Si c'est le cas, nous chercherons à déterminer si l'un des deux pansements est plus efficace que l'autre.

Ce projet a été conçu dans le respect de la règle des 3R, i.e. remplacement, réduction et raffinement. Remplacement : il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes permettant d'éviter l'expérimentation animale pour tester le pouvoir ostéogénique de biomatériaux destinés à la reconstruction osseuse chez l'Homme. Réduction : Ce modèle de petit défaut osseux bilatéral permet d'opérer les deux pattes du rat pour réduire de moitié le nombre d'animaux. Nous avons calculé le nombre minimum d'animaux par groupe, nombre permettant d'appliquer une analyse statistique significative. Raffinement : Toutes les expériences et manipulations des animaux seront effectuées avec le souci de préserver le bien-être de l'animal : Par la combinaison d'anesthésies générale et locorégionale ; par l'application de protocole d'analgésie pré- et post-opératoire ; par le suivi des animaux selon une grille d'évaluation prévoyant le recours à des points limites précoces et adaptés.

8169 Chez les ruminants, les diarrhées néonatales sont des sources fréquentes de pertes de production, de mal-être animal ou bien de mortalité. Parmi les différents pathogènes concernés, *Cryptosporidium parvum* est un parasite qui provoque des diarrhées entre 4 et 20 jours de vie chez les veaux. Notre laboratoire développe une nouvelle solution préventive pour prévenir les lésions et améliorer la protection des animaux vis-à-vis de la cryptosporidiose. L'objectif de ce projet est de mettre en place un modèle d'infection chez le veau, non létal, qui nous permettra dans un second temps de valider l'efficacité du candidat médicament. Il nous permettra d'évaluer, la sensibilité du veau en fonction de l'âge et la dose requise d'oocystes de *Cryptosporidium parvum* pour modéliser une infection.

Ces différentes expérimentations seront réalisées sur une période de 1 an et nécessiteront un grand maximum de 18 veaux.

La règle des trois R a été strictement respectée.

Remplacement : Toutes les mesures de « remplacement » ont été considérées au préalable à cette expérimentation. Néanmoins, ce projet ne peut être traité seulement in vitro pour plusieurs raisons. D'une part, la Cryptosporidiose fait intervenir un cycle parasitaire qui n'a lieu que chez l'animal vivant. D'autre part, la maturation du système immunitaire requiert la libre interaction entre les cellules du système immunitaire et le parasite. Enfin, les voies d'administration font intervenir des paramètres physiologiques de l'animal qui ne pourraient être modélisés in vitro.

Réduction : Le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été réduit à son minimum grâce à un plan d'expérience optimisé pour obtenir le maximum de données scientifiques. Les animaux entre dans l'étude par groupe de 6 (2 tests de 3 veaux en simultané), jusqu'à obtention du modèle. Cela permet d'éviter d'inclure tous les animaux d'un coup et potentiellement des animaux qui ne seraient pas nécessaires à l'étude. Une fois le modèle d'infection obtenu, cette étude préliminaire sera stoppée. Nous estimons qu'il sera nécessaire de tester 12 animaux avec des conditions différentes. 6 animaux supplémentaires sont prévus au cas où un ajustement du modèle serait nécessaire.

Raffinement : la méthodologie expérimentale a, elle aussi, été raffinée à son maximum par l'utilisation de méthodes analytiques répondant aux normes actuelles. Par exemple, le comptage d'oocystes sera

effectuée tous les jours sur la période d'excrétion afin d'augmenter le nombre de mesures, de réduire le nombre d'animaux in fine utilisés dans l'expérience. De plus, pour limiter le stress et améliorer la qualité de l'expérience, les besoins éthologiques des veaux seront pris en compte, notamment en termes de conditions d'ambiances, d'alimentation et d'enrichissement.

8170 Le rôle du microbiote ainsi que les mécanismes par lesquels différentes espèces bactériennes commensales confèrent une résistance aux infections sont à présent bien documentés. Ces mécanismes impliquent la barrière physique directe, la production de molécules inhibitrices ou encore le système immunitaire inné local. L'infection toxoplasmique naturelle survient lors de l'ingestion d'aliments contaminés par des kystes parasitaires ou des oocystes. Après le passage de la barrière épithéliale intestinale, le parasite va alors envahir de nombreux types de cellules dans la lamina propria de l'intestin grêle comme les macrophages, les cellules dendritiques ou encore les neutrophiles. Il va alors disséminer dans l'organisme et l'infection chronique caractérisée par la présence de kystes cérébraux et tissulaires va prendre place. Le microbiote pourrait interagir avec l'invasion du parasite en modulant sa capacité à traverser la barrière intestinale et à disséminer dans l'organisme. Le projet est basé sur un modèle original, le rat Lewis, réfractaire à l'infection à *Toxoplasma*, résistance portée par le locus *Toxo1* et sur la lignée de rats congéniques Lew-F (rat Lewis dont le locus *Toxo1* est celui du rat BN susceptible à l'infection). Notre hypothèse est que le microbiote spécifique de rats résistants et le système immunitaire inné contrôlé par *Toxo1* pourraient interagir pour restreindre l'infection et la diffusion du parasite. Ce projet est consacré à la caractérisation du microbiote intestinal à partir de souches de rats résistantes et sensibles et à l'analyse du rôle du microbiote intestinal dans la résistance ou la sensibilité à *T. gondii*.

Nous respecterons la règle des 3R. Au cours de ce projet, 215 rats seront manipulés, nous avons prévu des groupes avec un nombre minimum d'animaux. Les animaux seront observés régulièrement au cours des expériences afin de surveiller les points limites (perte de poids, changement de comportement, apparence physique) impliquant si nécessaire l'arrêt des expérimentations. Aucun modèle *in vitro* n'est disponible pour étudier le microbiote intestinal.

8171 Cette demande est un renouvellement d'une partie d'un projet précédemment autorisé pour 3 ans et arrivant à échéance. Les objectifs sont de former les apprenants (issus de l'enseignement supérieur ou du milieu professionnel), dans le respect de la réglementation en vigueur. Les apprenants suivent des enseignements théoriques sur la formation réglementaire, l'éthique et les méthodes alternatives (maquette pédagogique du DU d'Expérimentation Animale Niveau Conception et réalisation de procédures, ex Niveau 1). Cependant, le recours à des méthodes alternatives est donc impossible pour l'apprentissage et l'exécution des gestes sur animaux (remplacement). Tous les gestes techniques sont expliqués et réalisés préalablement par un enseignant-chercheur autorisé. Chaque groupe de 5 étudiants maximum (encadré par un enseignant-chercheur autorisé) travaille sur 5 à 10 animaux maximum. Les apprenants réalisent les manipulations sous la surveillance de l'enseignant-chercheur qui vérifie, le cas échéant, les doses, les volumes et fréquences d'administration selon le poids, les méthodes d'injection, la bonne réalisation des procédures et le respect de l'éthique (raffinement).

Les formations concernent les gestes de bases qui seront réalisés sur le rat :

- préhension, pesée, injections de liquide physiologique stérile sous-cutanée, intramusculaire, intra péritonéale, ou administration d'eau par voie orale par gavage
- anesthésie fixe pour comparaison et choix des anesthésiques, respect des doses
- respect de l'environnement aseptique pour petites interventions et soins cutanés
- pression artérielle mesurée avec un manchon à la queue
- recueil et mesure des urines pour dosages, après mise en cage métabolique maximum 24h
- effets de substances psychotropes (anxiolytiques, neuroleptiques ou stimulantes) chez le rat éveillé par mesure de l'activité motrice et de la capacité d'exploration

Afin de diminuer le nombre d'animaux utilisés (réduction), chaque animal pourra suivre en tout et au maximum 4 procédures légères parmi les 5 procédures espacées par 48 h minimum de repos, et une

procédure modérée. Les animaux non euthanasiés seront utilisés après une semaine de repos minimum comme donneurs d'organes dans des projets de recherche.

En se basant sur la période 2013-2015, entre 3 et 4 groupes de 5 apprenants sont accueillis chaque année, ce qui nécessitent 40 rats par an afin de permettre une rotation et le respect des périodes de repos entre chaque manipulation. Au total, pour la durée demandée de 5 ans, 200 animaux maximum seront utilisés pour cette formation.

8172 Chez les mammifères, la quantité de glucose (sucre) dans le sang (glycémie) est régulée, entre autres, par la sécrétion d'insuline par le pancréas. En effet, lorsque la glycémie augmente (par exemple à la suite d'un repas), le pancréas sécrète de l'insuline qui va permettre de faire rentrer ce glucose dans les tissus et de revenir à une glycémie normale (1 g/l chez l'humain). Le diabète de type 2 est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique, c'est-à-dire par un taux trop élevé de glucose dans le sang, qui peut être associé à une insulino-résistance (les tissus ne répondent pas bien à l'insuline) et à une hyper-insulinémie. Cette maladie survient généralement chez les adultes avançant en âge, et touche davantage les personnes obèses ou ayant un surpoids. Le diabète résulte de la combinaison de facteurs génétiques et environnementaux, ainsi que de facteurs liés au mode de vie. En général, chaque personne porte un bagage héréditaire qui la prédispose à souffrir de diabète ou au contraire la protège. Plusieurs gènes ont été identifiés comme étant impliqués dans le risque de développer un diabète de type 2, comme le gène KCNJ15. Une surexpression de ce gène pourrait en effet être responsable de l'apparition d'un diabète chez l'homme. Dans l'espèce caprine, il existe des mutants naturels qui présentent une duplication du gène KCNJ15. Le but de notre projet consiste à évaluer la régulation de la glycémie par l'insuline chez ces animaux afin de déterminer si leur métabolisme du glucose est affecté par cette mutation. En effet, dans le cadre de cette maladie métabolique complexe, la confirmation dans un modèle animal du rôle du gène KCNJ15 dans le métabolisme du glucose est importante pour la compréhension des mécanismes chez les patients. Dans le cadre de notre analyse, 15 animaux adultes de sexe mâle (5 boucs non mutants, dits "sauvages", 5 boucs mutants hétérozygotes et 5 boucs mutants homozygotes) seront soumis à un protocole de tolérance au glucose. Le test utilisé analyse à la fois la réponse de l'organisme à une injection de glucose et à une injection d'insuline. Les animaux n'ont pas à être à jeun pour ce test et ils auront accès à du foin pendant toute l'expérimentation. En pratique, nous allons d'abord poser des cathéters sur les veines jugulaires des animaux après anesthésie locale. Ensuite, une dose précise de glucose sera injectée dans la veine jugulaire droite, et des prélèvements sanguins seront effectués à différents temps à partir du cathéter de la veine jugulaire gauche afin d'évaluer la vitesse d'élimination du glucose par l'organisme. Après 20 minutes, une injection d'insuline sera effectuée dans la veine jugulaire droite et les prélèvements suivants permettront d'évaluer la réponse de l'organisme à l'insuline injectée. Les échantillons prélevés seront utilisés pour doser le glucose et l'insuline et la réponse physiologique des animaux sera analysée grâce à un logiciel prévu à cet effet. Cette étude sera réalisée uniquement dans un seul des deux sexes afin de simplifier l'analyse des résultats car la physiologie et le métabolisme sont différents entre mâles et femelles. Notre projet consistant à évaluer le statut métabolique (diabète ou non) de variants naturels de chèvres, l'utilisation de l'animal vivant est indispensable dans le cadre de notre protocole. Il est donc impossible de remplacer l'animal par un modèle cellulaire ou de simulation informatique. Par ailleurs, les mécanismes étudiés impliquent des processus métaboliques complexes faisant intervenir différents organes, rendant impossible le remplacement de l'animal par des lignées cellulaires établies.

Le protocole de test de tolérance au glucose est un protocole classique chez l'homme et l'animal, sans danger et n'induisant pas d'effets secondaires. Par ailleurs, les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions sur les animaux, en particulier par la pose de cathéters intraveineux permettant d'éviter les piqûres répétées. De plus, les animaux utilisés sont habitués à être manipulés. Néanmoins, l'équipe expérimentale s'assurera tout au long de l'expérimentation (4 heures) que les animaux ont un comportement normal et les prélèvements seront arrêtés et le cathéter enlevé si les animaux ne tolèrent pas la manipulation. En cas d'évènement indépendant du protocole (blessure, maladie, défaillance technique, statut sanitaire...), après discussion avec le personnel de l'unité expérimentale et le vétérinaire, la solution que nous adopterions dépendrait principalement de deux critères : le degré de souffrance de l'animal et la possibilité d'utiliser l'animal une fois guéri.

8173 L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un agent d'occlusion. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau. La technique est couramment utilisée pour traiter par exemple les fibromes utérins en alternative à la chirurgie, ou encore les cancers du foie. Différents types d'agents d'embolisation peuvent être utilisés. Des billes calibrées sont choisies quand le praticien doit contrôler précisément à quel niveau boucher les vaisseaux. Pour les fibromes, on utilise des particules de large diamètre ($>500\mu\text{m}$) pour éviter l'embolisation non ciblée des artères ovariennes. A l'inverse pour les tumeurs hépatiques, on privilégie des particules de petits calibres ($\leq 100\mu\text{m}$) pour pénétrer à l'intérieur de la tumeur et épargner le tissu sain du foie. Le médecin doit donc être sûr que l'agent occlusif va boucher des vaisseaux correspondant à son calibre. Des billes ont été rendues détectables en imagerie par rayon X ou en IRM. La visualisation des billes sur les images radiologiques permettra de savoir si elles ont bien atteint la tumeur ou si des billes ne sont pas parties dans des zones non visées, ou encore si l'ensemble de la lésion a bien été traitée.

Le projet a pour objectif l'évaluation de la distribution et de l'efficacité des microsphères d'embolisation détectables en rayon X / IRM sur un modèle de tumeur hépatique chez le lapin.

La taille du lapin permet l'utilisation des mêmes appareillages que chez l'homme, contrairement aux rongeurs. Le modèle tumoral utilisé est connu, reproductible, facilement implantable, à croissance rapide et transplantable dans de nombreux organes.

Le projet décrit l'implantation des cellules tumorales dans le foie de l'animal et la procédure d'embolisation de ces tumeurs. On estime que 40 lapins seront utilisés pour ce projet pour une période de 5 ans.

Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour demande d'autorisation de mise sur le marché.

Principe des 3R :

- Remplacement : Des tests in vitro sont réalisés dans les premières phases de développement des produits pour déterminer leurs propriétés physiques (granulométrie, élasticité) et éliminer les prototypes ne présentant pas des caractéristiques satisfaisantes. Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent être modélisées dans des systèmes in vitro : contact avec le sang, réseau vasculaire complet, effets de l'occlusion des vaisseaux et réactions biologiques aux implants, ce qui implique le recours à l'animal vivant.

- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est principalement basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données. Ce nombre est au minimum de 3 par groupe d'étude.

- Raffinement : des mesures préventives contre la douleur sont utilisées avec anesthésie générale gazeuse et analgésie par des morphiniques pendant et après les procédures susceptibles d'induire une souffrance. Pendant l'étude, un suivi quotidien des animaux est mis en place avec une évaluation quantitative de la douleur; la cause de la douleur est recherchée par des examens vétérinaires et sanguins afin de définir le moyen qui permettra de la réduire au maximum.

8174 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente après la maladie d'Alzheimer. Cette pathologie est caractérisée sur un plan clinique principalement par un ralentissement moteur et des tremblements. Au niveau cérébral, les symptômes ont été associés à une perte de neurones produisant un composé chimique, la dopamine, dans une région du cerveau. Cependant l'origine de cette maladie est encore mal connue. De nouvelles données suggèrent que l'accumulation anormale d'une protéine, dénommée l'alpha synucléine dans les neurones, serait une des causes de la mort des neurones dopaminergiques. Ce mécanisme, est considéré comme central dans la genèse et l'évolution de la maladie. Sa compréhension est donc essentielle dans le développement de nouveaux outils thérapeutiques à l'identification d'un nouveau composé thérapeutique.

Le but de ce projet est donc de développer un modèle préclinique murin qui manifesterait certains aspects de l'alpha-synucléinopathie humaine à des fins thérapeutiques.

La mise à disposition récente des souris transgéniques dont les neurones présentent une hypersensibilité à l'alpha-synucléine associé à l'injection intracérébrale d'alpha synucléine permettrait la recrudescence des phénomènes anatomo-pathologiques connus dans la maladie de parkinson.

Pour répondre à cette question, nous utiliserons 7 groupes d'animaux de 5 animaux. La répartition des animaux sera la suivante :

- 6 groupes de 5 animaux de souris transgéniques injectées avec 5 formes différentes de alpha-synucléine et 1 groupe avec du PBS.
- 1 groupe de souris contrôle de 5 animaux injecté avec du PBS.

Les animaux seront euthanasiés 75 jours après les chirurgies stéréotaxiques pour explorer la transmission de la pathologie et nous effectuerons des tests histologiques et biochimiques afin de définir l'efficacité de ce modèle.

Dans le respect des 3 R, nous allons tester 5 formes différentes d'alpha-syn et un contrôle, nous utiliserons donc 35 animaux avec un nombre de 5 par groupe afin de réduire le nombre tout en ayant assez de données pour établir des statistiques solides. L'observation des effets des injections intracérébrales sur une durée de 75 jours au niveau du cerveau nous contraint à utiliser des animaux.

Pour le respect du R de raffiner, nous avons vérifié qu'aucune donnée sur le composé n'entraîne une souffrance chez l'animal. Les souffrances liées aux chirurgies seront soulagées via des molécules les plus adéquates. Le bien-être des animaux sera pris en compte tout le long de l'étude.

8175 Contexte scientifique :

Les maladies cardiovasculaires représentent la première cause de décès dans le monde. Malgré les progrès récents et la mise en place de stratégies thérapeutiques visant à diminuer le mauvais cholestérol dans le sang, plus de 17 millions de patients décèdent de pathologies cardiovasculaires chaque année. Récemment, l'inflammation est apparue comme une composante centrale contribuant au développement des maladies cardiovasculaires mais les mécanismes qui régissent cette inflammation restent inconnus. Ce projet vise à identifier et valider de nouvelles voies métaboliques qui contribuent à l'inflammation liée aux maladies cardiovasculaires.

Problématique :

Le dérèglement des cellules immunitaires est souvent associé à la progression des maladies cardiovasculaires. Le recrutement de monocytes du sang périphérique au niveau de la plaque d'athérome est considéré comme un des mécanismes majeurs contribuant à la progression de l'athérosclérose. Néanmoins, les voies métaboliques responsables de la mobilisation des monocytes à partir de la moelle osseuse (lieu de leur génération) et, favorisant leur migration vers la plaque, restent à ce jour mal comprises. L'identification des voies métaboliques à l'origine de la mobilisation des monocytes pourrait permettre de contrôler le nombre de monocytes dans le sang périphérique et leur recrutement au niveau de la plaque d'athérome.

Hypothèse de travail :

Notre projet de recherche vise à étudier la dynamique des monocytes et macrophages au cours des maladies cardiovasculaires. Pour cela nous allons utiliser des modèles murins appropriés afin de déterminer les mécanismes qui régulent l'activité de ces cellules. Nous analyserons cela dans des modèles précliniques de pathologies cardiovasculaires bien définis et validés par la communauté scientifique.

Justification du modèle et raffinement :

Les maladies cardiovasculaires sont des pathologies complexes dans lesquelles de multiples voies métaboliques et physiologiques interviennent. Une approche de culture cellulaire n'est pas adaptée afin de répondre aux demandes de cette problématique. Des modèles murins athérogéniques ont été développés et validés par la communauté scientifique comme outils d'études précliniques. Pour répondre à la règle des « 3R » nous allons utiliser des tests statistiques nous permettant de réduire le nombre d'animaux afin de pouvoir tout de même répondre clairement à notre question scientifique. Les procédures proposées sont basées à la fois sur une justification scientifique et tiennent compte du bien-être animal. Comme décrit précédemment, aucune méthode alternative in vitro ou in silico

n'est adapté afin de remplacer le modèle murin. La mise en place de points limites permet l'amélioration du bien-être animal afin de supprimer la détresse ou l'angoisse des animaux.

Perspectives :

Cette étude pourrait ouvrir de nouvelles perspectives de traitement visant à mieux contrôler la mobilisation et le recrutement des monocytes dans les maladies cardiovasculaires. Afin de pouvoir conclure sur l'importance de cette voie métabolique nous avons calculé (test de significativité statistique) que 400 souris devraient être utilisées et réparties sur une période de 4 ans. L'ensemble des procédures proposées dans ce projet sont connues comme non remplaçables, par des procédures ne faisant pas intervenir directement l'animal.

8176 La maladie d'Alexander (AXD) est une maladie génétique du système nerveux central. Cette maladie progressive débute parfois à l'âge adulte mais plus souvent pendant l'enfance (de la naissance à l'adolescence). Cliniquement, elle est responsable d'une dégradation neurologique avec des troubles moteurs et cognitifs, et d'une épilepsie. L'évolution de cette maladie neurodégénérative est lentement progressive dans les formes débutant chez l'adulte, mais beaucoup plus rapide dans les formes à début pédiatrique, elle conduit rapidement à un handicap neurologique lourd (dépendance complète) et à une mortalité précoce. Du point de vue neuropathologique, l'AXD est caractérisée par la présence d'agrégats protéiques dans le cytoplasme des astrocytes, appelés fibres de Rosenthal ; il existe également une perte myélinique et une anomalie de la barrière hémato-encéphalique. Cette maladie est liée à des mutations dominantes de la GFAP (le plus souvent situées dans le « rod-domain », mais parfois dans le « tail-domain »), les mutations surviennent le plus souvent de novo (formes sporadiques) mais elles peuvent être plus rarement héritées (formes adultes). La GFAP est une des protéines constituant le cytosquelette des astrocytes, un des types cellulaires constituant le système nerveux central. Il n'existe pour le moment aucune thérapeutique spécifique permettant d'empêcher ou de retarder le développement et la progression de cette maladie touchant exclusivement le cerveau et la moelle dont l'issue est fatale.

Pour envisager des stratégies thérapeutiques dans l'AXD, il est essentiel de disséquer les mécanismes conduisant de la mutation de la GFAP à une démyélinisation progressive, un dysfonctionnement neuronal et une anomalie de la barrière hémato-encéphalique qui restent actuellement mal compris. Comme dans d'autres maladies neurologiques, il est impossible d'obtenir des prélèvements de tissu atteint par la maladie (cerveau et moelle épinière exclusivement) avant le décès des patients. De plus, il n'existe aucun marqueur biochimique dans cette pathologie et les seules informations concernant l'évolution de la maladie reposent sur l'examen clinique, la neuroradiologie (TDM, IRM) et l'électrophysiologie, qui ne permettent pas d'identifier les mécanismes moléculaires et cellulaires en cause. Les modèles animaux sont donc essentiels pour comprendre la physiopathologie de l'AXD ainsi que pour envisager et tester des stratégies thérapeutiques.

Les études réalisées jusqu'à présent sur des modèles cellulaires ou animaux d'AXD ont permis de conclure que les mutations de la GFAP conduisent à un gain de fonction; que la surexpression de GFAP induit la formation d'agrégats de GFAP associée à un stress cellulaire avec une sensibilité accrue aux crises épileptiques induites et une mort astrocytaire et neuronale. Malgré ces travaux, les mécanismes précis restent à disséquer.

Ce projet vise à étudier les conséquences des mutations GFAP au cours du développement, en particulier sur les interactions cellulaires dans le système nerveux central, afin d'en comprendre l'impact en pathologie humaine; et à tester in vitro puis in vivo différentes des stratégies thérapeutiques. Nous travaillons pour cela sur 2 lignées de souris porteuse de deux mutations différentes de la GFAP.

Nous prévoyons d'étudier 630 souris pour ce travail, et nous veillerons tout au long de ce travail à appliquer la règle des 3R : 1. Réduction, nous utiliserons le nombre de souris minimum permettant d'obtenir des résultats statistiquement significatifs ; 2. Raffinement, afin de préserver au mieux le bien-être des animaux nous veillerons à éviter inconfort, douleur, angoisse, détresse au animaux, et à assurer tout au long de l'étude les meilleures conditions de transport, d'élevage et d'hébergement (période d'acclimatation soins, état sanitaire, enrichissement du milieu, qualité des locaux d'expérimentation) ; 3. Remplacement, l'étude sur ces modèles murins nous permet d'analyser les conséquences des mutations sur les astrocytes, mais aussi sur l'ensemble des cellules du système

nerveux central, d'étudier les interactions cellulaires et de tester des drogues candidates (sélectionnées au préalable dans un modèle in vitro) dans un modèle intégré.

8177 Les maladies inflammatoires aujourd'hui regroupées sous le terme d'IMID (immune mediated inflammatory disease) ont une incidence en constante augmentation notamment dans les pays industrialisés. Elles peuvent être systémiques comme le lupus, la polyarthrite rhumatoïde et les vascularites ou elles peuvent être localisées à un seul organe comme le diabète, la sclérose en plaque, la maladie de Crohn, la rectocolite hémorragique, ou encore le psoriasis. Parmi ces maladies inflammatoires, certaines sont auto-inflammatoires et d'autres auto-immunes, elles ne mettent pas en jeu les mêmes cellules du système immunitaire mais dans tous les cas, cela conduit à une réponse inflammatoire exacerbée. Cette inflammation entraîne la formation de lésions, une réparation tissulaire inefficace voire la destruction de l'organe dans les formes les plus sévères.

Les traitements actuels essaient de limiter cette inflammation à l'aide de différentes molécules notamment chimiques donc non-spécifiques. Ces dernières années, de gros progrès ont été faits dans la compréhension de la réponse immunitaire et il est évident aujourd'hui que le système immunitaire, qui est le principal acteur dans les maladies inflammatoires, est une cible prometteuse. De tels traitements ont fait l'objet d'essais cliniques dans différentes pathologies de l'inflammation comme les molécules inhibitrices du TNF-alpha (une des principales cytokines sécrétées par le système immunitaire innée et responsable de l'inflammation). Seulement, l'effet de ces molécules n'est pas spécifique à la pathologie mais à l'ensemble des réponses immunitaires et elles sont associées à de nombreux effets secondaires.

Les nouvelles stratégies d'immunothérapie cherchent à améliorer l'effet anti-inflammatoire des traitements en limitant les effets secondaires et pour cela les approches sont plus spécifiques de populations cellulaires ou des mécanismes immunitaires spécifiques de l'organe pathologique. Parmi les populations du système immunitaire, il existe des populations suppressives de la réponse inflammatoire. Augmenter leur fonction suppressive pourrait conduire à limiter l'inflammation engendrée par les populations effectrices. De nouveaux récepteurs à la surface de ces cellules ont été identifiés comme ayant un rôle dans la modulation de leur fonction inflammatoire.

Nous aimerions tester différentes molécules capables d'activer un de ces récepteurs et analyser les effets engendrés par cette activation dans différents modèles animaux de maladies inflammatoires.

Ce type d'étude nécessite une preuve d'efficacité in vivo dans des modèles précliniques, c'est pourquoi nous voulons tester ces thérapies chez la souris et un de ces modèles est disponible avec la souris NOD (Non obese diabetic). Le nombre d'animaux utilisé sera de 240 souris pour combiner un nombre réduit d'animaux avec une pertinence statistique. Le suivi des animaux sera quotidien et la gestion de la douleur maîtrisée le plus adéquatement possible afin d'apporter les soins nécessaires le plus rapidement aux animaux. Pour limiter le stress et l'inconfort, les animaux sont maintenus dans des cages ventilées dans un cycle jour/nuit de 12h/12h avec un accès à l'eau et à la nourriture à volonté ainsi qu'un nombre maximum de 5 animaux/cage et des brindilles de papier pour s'enfouir et se cacher.

8178 Dans le cadre de ses missions de référence de l'Union européenne (LRUE), notre laboratoire évalue chaque année la performance des laboratoires nationaux de référence (LNR) intervenant dans la surveillance de la rage et mettant en œuvre des techniques de diagnostic. Ce diagnostic consiste en la mise en évidence du virus rabique dans le cerveau d'animaux dits « suspects ». L'évaluation de performance repose sur l'organisation d'essais inter-laboratoires (EILs) qui nécessitent la fourniture d'échantillons biologiques aux laboratoires participants. Ces EILs permettent aux laboratoires de i) s'évaluer sur les méthodes de routine qu'ils mettent en œuvre pour le diagnostic de rage, ii) d'assurer la qualité de leurs résultats et iii) de démontrer leur compétence dans leur domaine d'activité.

Le présent projet vise à générer du matériel biologique (matière cérébrale infectée par le virus) qui entrera dans la composition des panels d'échantillons distribués aux laboratoires. La France étant indemne de rage, il est donc impossible d'avoir recours à des prélèvements de cerveaux issus d'animaux naturellement infectés. De ce fait, il est nécessaire de recourir à l'infection expérimentale (par différentes souches virales rabiques) de souris de laboratoire afin d'obtenir des cerveaux de souris en quantité suffisante et qualité homogène. Des productions de diverses souches virales

rabiques sont réalisées avant chaque EIL afin d'obtenir un panel d'échantillons variés représentatifs des souches rencontrées chez les animaux naturellement infectés. Pour chaque production, les souris sont anesthésiées puis infectées par administration intracérébrale d'une dose de virus rabique définie. Après apparition des signes cliniques caractéristiques de la rage, les animaux sont euthanasiés et les cerveaux récoltés. Après avoir contrôlé sa qualité (homogénéité et stabilité), la matière cérébrale est réparti en tubes puis lyophilisée pour constituer un échantillon du panel.

Toutes les souris du projet reçoivent un enrichissement de leur milieu (abris, morceaux de bois à ronger, cellulose pour la confection de nid) et sont contrôlés quotidiennement afin de vérifier leur état de santé. Des points limites sont par ailleurs appliqués afin de limiter la souffrance des animaux lors des productions et des titrages des virus rabiques. Le nombre d'animaux utilisés pour chaque production de virus rabique est tributaire du nombre de laboratoires qui participent aux EILs. En règle générale, l'utilisation de 480 souris par souche produite permet de préparer un nombre suffisant d'échantillons à distribuer pour une cinquantaine de laboratoires participants. Ainsi, en se basant sur l'activité des 3 dernières années et sur le nombre de participants aux EILs, une utilisation d'environ 16800 souris est estimée sur les 5 années du projet.

8179 L'obésité est un problème majeur de santé publique à forte prévalence dans les pays industrialisés. Les dernières données recueillies en France montrent en effet que 32% des adultes sont en surpoids et que 15% sont obèses. En marge des traitements diététiques et d'accompagnement de première intention et des solutions instrumentales ultimes comme la chirurgie bariatrique, l'arsenal thérapeutique actuel est d'autant plus réduit que des médicaments sont retirés des officines. Il est maintenant bien établi que certains neuropeptides jouent un rôle clé dans le contrôle de la prise de nourriture. De fait, nous avons démontré que l'administration intra-cérébroventriculaire de l'octadécaneuropeptide ODN entraîne une forte diminution de la prise de nourriture et qu'il joue un rôle clé dans l'intégration centrale des variations de la glycémie. L'objectif de notre demande, soutenue par un financement ANR et rédigée selon le guide des 3R, est d'étendre la compréhension de la régulation de l'homéostasie glucidique par l'ODN et ses analogues chez la souris pour envisager des nouveaux traitements contre l'obésité et le diabète. Notre choix s'est tourné vers de rongeur pour 2 raisons majeures : 1/ la majorité des études visant à déterminer les mécanismes centraux mis en jeux dans la régulation centrale de l'homéostasie énergétique ont été réalisées chez la souris, et 2/ nous disposons au laboratoire d'une lignée de souris transgéniques chez laquelle le gène codant le précurseur de l'ODN a été spécifiquement invalidé. Notre travail s'oriente vers 3 objectifs principaux, 1/ déterminer le rôle de l'ODN dans le métabolisme glucidique, 2/ étendre sa fonction dans le contrôle de l'homéostasie énergétique et 3/ proposer une voie d'administration acceptable pour le patient de nos molécules synthétisées.

Dans la mesure où aucun modèle de substitution permettant de mener à bien ces différents objectifs physiologiques et pharmacologiques n'est actuellement disponible, l'ensemble de l'étude sera réalisé in vivo chez la souris. Le nombre maximal d'animaux nécessaire à cette étude d'envergure est estimé à 580 (380 souris sauvages et 200 souris transgéniques). Seules des souris mâles seront incluses dans les groupes expérimentaux. Les animaux femelles seront soit conservés pour la reproduction soit affectés à d'autres protocoles. Cette répartition permettra d'obtenir des résultats statistiquement analysables et indépendants du cycle ovarien. Les groupes de souris ayant reçu une administration d'ODN ou d'un de ses analogues anorexigènes seront surveillés pendant et après le protocole et une grille décisionnelle d'arrêt sera établie afin de limiter une éventuelle souffrance des animaux due à une perte de poids excessive ou un refus d'alimentation. Dans le but d'améliorer la qualité de vie des animaux et ainsi la reproductibilité de nos résultats, les souris seront maintenues en cage standard conformément à la réglementation avec un enrichissement du milieu de vie constitué de nids en copeau de peuplier. A l'issue du protocole les animaux seront euthanasiés en accord avec la réglementation. A terme, cette étude nous permettra d'ouvrir des perspectives thérapeutiques et faciliter la prise en charge des patients souffrant d'obésité.

8180 En aquaculture, une des voies pour promouvoir une filière durable consiste à diversifier la production par la domestication de nouvelles espèces. La domestication est définie comme le processus par lequel une population s'adapte à l'homme et à l'environnement captif. Toutefois, les premières phases d'élevage d'une nouvelle espèce restent difficiles, reposent sur des processus coûteux et conduisent

souvent à un échec. Or, le potentiel de domestication et l'attractivité socio-économique peuvent être variables entre groupes de populations appartenant à une même espèce (intra-spécifique). Ces groupes peuvent présenter des spécificités locales et un potentiel pour l'aquaculture plus grand (ex : forte croissance, meilleure résistance aux maladies, faible agressivité). Ce potentiel de domestication doit être évalué à partir d'une approche intégrant plusieurs fonctions biologiques (multifonction). En effet, il est nécessaire de considérer des indicateurs issus de différentes fonctions biologiques et de ne pas se focaliser par exemple sur les performances de croissance seules. Des potentiels différentiels ont déjà été démontrés chez plusieurs poissons comme le saumon atlantique ou le bar européen où des populations d'origines géographiques différentes présentent des différences de croissance, de survie ou de morphologie. Une des solutions pour améliorer les premiers stades de domestication pourrait donc se trouver dans l'exploitation de la diversité intra-spécifique.

Notre étude se focalisera sur la perche commune qui présente un intérêt socio-économique. Différents points de blocage existent à l'heure actuelle en condition d'élevage : comportement (agressivité, cannibalisme), faible croissance ou encore sensibilité au stress (mortalités). Une approche multifonction sera menée pour pouvoir évaluer les différences de potentiels entre groupes de populations génétiquement différenciés pour les premiers stades de vie. Cela nécessitera d'évaluer la croissance et la survie par un suivi et des prélèvements réguliers d'individus sans douleur ou procédure spécifique. En revanche, il sera aussi nécessaire d'évaluer des indicateurs comportementaux et des paramètres liés à l'état physiologique global des individus, ce qui fait l'objet de la saisine ci-présente.

Trois groupes de populations sauvages génétiquement différenciés ont été choisis à partir d'une étude génétique réalisée précédemment. L'étude ciblera les premiers stades de vie, de l'éclosion à deux mois post-éclosion (phase nurserie). Pour chacun de ces groupes, trois populations vont être considérées afin de prendre en compte la variabilité intergroupe et intragroupe.

L'objectif de cette expérimentation est d'évaluer si ces groupes de populations génétiquement différenciés présentent des performances comportementales et physiologiques différentes dans un milieu d'élevage imposé.

Améliorer l'élevage de la perche passe notamment par l'identification de populations qui sont plus grégaires et donc moins agressives, justifiant l'intérêt du volet comportemental de cette étude. Il est aussi nécessaire d'évaluer l'état physiologique des individus à travers l'utilisation de deux indicateurs intégrateurs : la tolérance à l'hypoxie et la sensibilité à la température (challenge tests non invasifs et non létaux). Il a été démontré chez d'autres espèces que ces deux indicateurs sont des indices fiables de l'état de santé des individus. De plus, l'état physiologique pouvant être particulièrement impacté en situation d'élevage par des facteurs de stress, nous souhaitons approfondir l'étude de l'impact du stress à travers l'évaluation de paramètres immunitaires et physiologique post-stress pour identifier des groupes potentiellement moins sensibles au stress. Enfin, nous nous intéresserons à un autre point de comparaison entre une des populations sauvages avec une population domestiquée en termes d'interactions agressives. Cela permettra d'évaluer l'impact potentiel de la domestication sur l'agressivité.

Les conditions d'élevage ont été fixées pour placer les individus dans les meilleures conditions possibles. Le nombre de poissons (5865) a été calculé afin d'obtenir une puissance statistique a priori suffisante pour espérer obtenir un résultat significatif tout en respectant la règle des 3R (réduction). Cinq procédures expérimentales seront conduites. Pour l'évaluation de la structure sociale, 15 individus seront utilisés afin de pouvoir évaluer les interactions interindividuelles ce qui nécessite un groupe suffisamment grand pour qu'une structure sociale apparaisse. Concernant, l'évaluation de l'état physiologique global, il existe une très forte variabilité interindividuelle lors de tests de tolérance à l'hypoxie et de sensibilité à la température. Il est donc nécessaire de travailler sur au moins 100 individus pour pouvoir comparer les populations entre elles. Pour les tests liés à la résistance au stress et au statut immunitaire, il est nécessaire d'avoir au moins dix individus pour prendre en compte la variabilité physiologique interindividuelle. Enfin, pour évaluer les interactions agressives entre domestiqués et sauvages, il est nécessaire d'avoir un plus grand nombre d'individus et de se rapprocher des conditions aquacoles d'où un minimum de 100 larves. Dans ces évaluations des performances entre groupes de populations, il n'est pas possible de remplacer les animaux par des modèles cellulaires ou moléculaires. En effet, l'objectif est de déterminer si des performances

différentes apparaissent entre les populations et celles-ci (inconnues) ne peuvent pas être prédites ou analysées in vitro. Au cours de l'ensemble de la phase expérimentale (phase d'élevage, tests), l'apparition de points limites (maladies, changement de l'activité de nage, du comportement alimentaire) ou toute souffrance conduira à l'exclusion de l'individu de l'expérience (raffinement).

8181 L'allergie chez le chien provoque de nombreux symptômes, dont le prurit. Le prurit est une sensation de démangeaison qui engendre l'envie de se gratter. Ces grattements peuvent alors entraîner une perte de poils et des lésions cutanées qui peuvent s'infecter. Une protéine a été identifiée comme ayant un rôle clef dans le déclenchement de ces démangeaisons. C'est pourquoi, avec notre partenaire industriel nous souhaitons mettre au point un traitement antiprurigineux, basé sur l'injection de cette protéine qui aura été modifiée pour bloquer son activité, dans un modèle de souris. Six protéines modifiées seront testées chez la souris, la ou les protéines qui auront donné les meilleurs résultats chez la souris seront ensuite testées chez le chien. Le but final de cette étude est d'identifier la protéine à injecter aux chiens allergiques afin qu'ils cessent de se gratter et ainsi retrouver leur bien-être.

Ce projet se découpe en 4 études : A) Valider le modèle murin utilisé pour la provocation de grattage, B) Comparer l'activité de la protéine commerciale et celle produite au sein de notre laboratoire. Cette comparaison est indispensable car les chimères seront produites au sein de notre département de production. C) Etudier l'effet dose de la protéine produite et D) Etudier l'efficacité des chimères à protéger les souris du prurit. Un groupe contrôle avec adjuvant sert à confirmer que l'addition d'un peptide infidèle en C-ter de la protéine native n'a pas seulement un rôle d'adjuvant.

11 procédures sont décrites dans ce document, mais ne seront pas toutes subies par toutes les souris, en fonction du protocole. Les souris seront anesthésiées puis identifiées individuellement par implantation d'une bague à l'oreille, pendant cette anesthésie certaines souris seront rasées sur 2 zones de 1cm² pour permettre l'injection intradermique d'une solution de la protéine native ou chimérique. Toutes les souris subiront un ou plusieurs prélèvements sanguins, du sérum sera récupéré et des analyses biochimiques seront effectuées afin d'identifier le type d'anticorps fabriqués. 4 types d'injections seront effectués, par voie intradermique, sous cutanée, intraveineuse et intrapéritonéale. Pour caractériser au mieux la provocation de grattements, il est bien entendu nécessaire de compter les grattements induits mais également de mesurer la température corporelle des souris, leur fréquence respiratoire et leur pression sanguine.

368 souris femelles adultes seront incluses dans ce projet. Elles seront hébergées par groupe de 4 et 6 souris dans des cages adaptées et enrichies avec un tunnel ou un igloo.

L'induction du prurit ne peut pas être étudiée sur un modèle in vitro (remplacement). Le nombre de 368 souris est le nombre nécessaire et suffisant pour aboutir à des résultats statistiquement exploitables (réduction). Les souris de souche Balb/c ont déjà fait l'objet de telles recherches et tout sera mis en œuvre pour assurer leur bien-être, ambiance, enrichissement et soins (raffinement). Les souris sont maintenues dans un cycle jour-nuit de 12h à une température de 22±2°C et une hygrométrie de 55±20%. Elles disposeront de nourriture et d'eau ad libitum. Un contrôle visuel des souris sera réalisé tous les jours. Une souris recevra les soins nécessaires en cas d'apparition de lésions cutanées, conjonctivite, bagarres. En cas d'aggravation malgré les soins ou d'apparition d'autres signes tels que prostration, pilo-érection, diarrhées, hypothermie, perte de poids, cette souris sera euthanasié selon une méthode réglementaire.

8182 Avec une incidence de 1/500 -1/1000, la polykystose rénale autosomique dominante (ADPKD) est la maladie génétique humaine la plus courante. La PKD est due à des mutations des gènes PKD1 (85%) ou PKD2 (15%) qui codent, respectivement, pour les protéines polycystine-1 et polycystine-2. D'une manière générale, l'évolution de la maladie dépend du gène concerné par la mutation. Lorsque la mutation concerne le gène PKD1 la maladie progresse plus rapidement pour évoluer vers l'insuffisance rénale terminale (IRT) à l'âge moyen de 54 ans, si le gène PKD2 est concerné l'IRT est atteinte vers l'âge moyen de 74 ans.

Aujourd'hui il existe un seul traitement sur le marché aux effets bénéfiques modestes. Ainsi, d'un point de vue scientifique, la recherche de nouveaux candidats-médicaments ainsi que de biomarqueurs spécifiques et précoces de la progression de la polykystose rénale est primordiale.

Nous prévoyons de mettre en place un nouveau modèle murin de l'ADPKD au sein de notre établissement afin de pouvoir effectuer des tests d'efficacité de molécules thérapeutiques éventuelles ainsi que de la recherche de biomarqueurs. Ce modèle repose sur une inactivation conditionnelle du gène PKD1, mimant alors le phénotype d'ADPKD le plus sévère. Dans cet objectif, nous prévoyons de maintenir différentes lignées de souris nous permettant, par croisement de ces lignées, d'inactiver le gène PKD1 à différents moments de développement de l'organisme. Nous aurons alors à notre disposition un modèle hautement flexible.

La réalisation de tests d'efficacité d'une molécule potentiellement thérapeutique in vivo sur un modèle homologue de la PKD est incontournable afin d'évaluer l'activité d'un produit dans des organismes complets et complexes (pas de Remplacement possible). Des tests de toxicité in vitro seront réalisés au préalable en accord avec l'objectif de réduire le nombre d'animaux utilisés. Trois lignées de souris seront maintenues en continu. Deux lignées initiales serviront à établir une troisième lignée transgénique par croisement. Seuls les hybrides issus de ce croisement pourront être affectés par la pathologie après administration d'une molécule spécifique induisant la délétion du gène PKD1. Ainsi, la pathologie, c'est-à-dire un développement progressif de kystes dans les reins et parfois le foie, pouvant mener finalement au dysfonctionnement complet de ces organes, sera uniquement déclenchée chez les animaux nécessaires pour des études d'efficacité de molécules ou la recherche de biomarqueurs. Par conséquent, le phénotype dommageable ne sera déclenché que chez les animaux nécessaires pour ces études. Ainsi, le nombre d'animaux souffrant de la pathologie est minimisé (Raffinement des procédures). Les signes de toxicité et le poids corporel des animaux seront enregistrés deux fois par semaine jusqu'à la fin de l'expérience. Un suivi clinique de chaque animal sera réalisé quotidiennement. Le nombre total d'animaux utilisé pour les procédures scientifiques (tests d'efficacité, recherche de biomarqueurs, etc.) peut être estimé à 18 000 sur les 5 prochains années. Ce nombre est basé sur l'utilisation du minimum d'animaux par groupe afin d'avoir une puissance statistique suffisante pour en pas avoir à reproduire le même essai à plusieurs reprises.

8183 La décitabine est utilisée pour la prise en charge des patients de plus de 65 ans atteints d'une leucémie aigüe myéloïde et non candidats à une chimiothérapie d'induction standard. Malheureusement, ce traitement n'est actuellement disponible que par voie intraveineuse. Afin d'améliorer le confort des patients et réduire les risques liés à l'injection, la voie orale est donc préférable. Néanmoins, la décitabine possède une faible biodisponibilité après administration par voie orale. Nous avons développé des nano-capsules lipidiques qui permettent d'encapsuler la décitabine ou la décitabine-C12.

Le projet faisant l'objet de cette demande d'autorisation est donc dédié à l'évaluation chez des rongeurs de ces nano-vecteurs administrés par voie orale et par voie intraveineuse. Un maximum de 170 rats et 160 souris seront inclus dans ce projet pour répondre aux problématiques explorées. Les tests statistiques dépendront des résultats obtenus (Mann et Whitney). Ce nombre d'animaux a été réduit au maximum pour que les résultats obtenus soient exploitables, statistiquement significatifs afin d'éviter d'avoir à refaire les manipulations et non critiquables. Des points limites liés au comportement de l'animal (état général et masse de l'animal) ont été fixés et les animaux les atteignant seront euthanasiés. De plus, Les animaux seront hébergés dans des cages enrichies en tenant compte de la réglementation en vigueur concernant la densité d'animaux par cage ainsi que les conditions nécessaires à leur bien être (les animaux sont dans la pénombre la plupart du temps (éclairage 12h/24h, et lors des période d'éclairage celui-ci est adapté pour des animaux albinos), température 21°C+/-2 contrôlée en permanence, dimension des cages adaptées à l'espèce et au nombre d'animaux logés dedans, alimentation issue de fournisseur agréé, à volonté). Enfin, des premières études réalisées in vitro sur des cellules ont démontré que les formulations permettaient d'augmenter le passage cellulaire de la décitabine. Néanmoins, ces résultats doivent être confirmés dans des conditions qui ne peuvent pas être mimées in vitro. Ce projet s'inscrit donc dans une démarche éthique appliquée à l'expérimentation animale en respectant la « règle des 3R ».

8184 Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent avec 49 000 nouveaux cas par an en France métropolitaine. Malgré les avancées réalisées pour cette pathologie, ce cancer est associé à un nombre de décès important (12 000/an en France). Aujourd'hui, l'enjeu scientifique est d'améliorer les connaissances fondamentales pour mieux comprendre la biologie des cancers du sein afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

L'objectif de ce projet est de démontrer le rôle d'un gène dans la tumorigenèse in vivo. Pour cela, le poisson-zèbre sera utilisé comme modèle animal afin de déterminer si le gène d'intérêt accélère la formation de tumeurs, connues pour évoluer lentement. Il est attendu que les animaux génétiquement modifiés (délétions du gène d'intérêt) développeront plus de tumeurs à l'âge adulte que la population normale. Ce projet durera 4 ans et permettra de déterminer l'intérêt de ce gène pour des applications clinique en cancérologie. Ce projet a été construit pour suivre la conformité de la règle des 3R.

Remplacer – Les approches substitutives (utilisation de modèles cellulaires ou d'échantillons de patients) ont permis d'identifier et de comprendre le rôle du gène d'intérêt dans la tumorigenèse. Ces approches substitutives ont aujourd'hui atteint leur limite et seule une étude chez l'animal pourra montrer le rôle direct de ce gène d'intérêt dans la tumorigenèse in vivo.

La stratégie pour mener à bien ce projet est d'utiliser des lignées de poissons-zèbre déjà établies par un laboratoire de recherche, qui fournira les individus nécessaires à l'étude. En effet, ce projet permettra de réutiliser des lignées disponibles et établies pour les besoins d'un projet scientifique précédent. L'utilisation de poissons-zèbre permettra de répondre à la problématique puisque ces animaux développent des tumeurs similaires à celle de l'homme. De plus, la taille réduite et le caractère grégaire de ce modèle animal permettront d'accéder facilement à un grand nombre d'individus, nécessaires pour les études d'incidence de tumeurs. L'utilisation du poisson-zèbre et de lignées préexistantes permettra de réduire le temps et le nombre d'individus nécessaire pour mettre en place le protocole puisqu'aucun nouveau modèle animal ne sera développé.

Réduire – Pour déterminer si le gène d'intérêt favorise et/ou accélère la formation de tumeurs à évolution lente, 4 groupes d'individus présentant ou non une altération du gène d'intérêt seront analysés. Le nombre d'individus sera réduit à son minimum (400) soit 100 individus par groupe analysé pour permettre des analyses statistiques robustes.

Raffiner - Au cours de la partie expérimentation animale, les poissons-zèbre seront observés par une méthode non-invasive (observation macroscopique) pour déterminer l'âge d'apparition de la première tumeur. Pour réduire l'angoisse, la souffrance ou la douleur, les poissons-zèbre seront contenus physiquement pendant l'observation macroscopique par immersion graduelle dans un bain frais. Des critères d'arrêt sont prévus dans le protocole pour éviter toute souffrance inutile. Il est prévu d'euthanasier l'animal dès l'identification d'une tumeur. Afin de s'assurer du bien-être des animaux, une observation quotidienne sera effectuée. A la fin du protocole, l'ensemble des animaux sera euthanasié.

Ce projet permettra d'identifier un nouveau gène d'intérêt en cancérologie qui pourrait s'avérer être une nouvelle cible thérapeutique. Il est prévu que le matériel biologique issu de ces animaux soit conservé pour en faire bénéficier la communauté scientifique.

8185 La carcinose péritonéale est une pathologie de très mauvais pronostic au cours de laquelle une multitude de métastases se développent dans la cavité péritonéale. Ces lésions sont la cause principale de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de cancer colorectal, ovarien, et de l'estomac notamment car les chirurgies et chimiothérapies sont peu efficaces. Cependant, la façon dont ces tumeurs apparaissent et acquièrent des phénotypes résistants demeure inconnue. Pour répondre à cette question, nous souhaitons développer des modèles tumoraux cellulaires (sphéroïdes) et animaux dérivés de tumeurs de patients afin de reproduire l'hétérogénéité biologique de manière relevante.

Le but de cette étude est de comprendre précisément comment les carcinoses péritonéales se forment chez différents patients, à partir de différents sous types tumoraux. Cette compréhension nous permettra de développer de nouveaux traitements, plus efficaces, et ainsi d'améliorer la qualité de vie des patients et leur survie.

Dans ce cadre, les souris nude immunodéficientes permettant de développer des modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les souris seront hébergées dans un environnement contrôlé dépourvu de germes pathogènes qui permet qu'elles ne souffrent pas de leur défaut d'immunité. Un total maximum de 1010 souris sera inclus. Les souris seront utilisées pour amplifier les tissus tumoraux humains dans le but de les utiliser lors de culture de sphéroïdes (culture cellulaire en 3D) et limiter ainsi l'emploi de nombreux animaux ; les souris assureront (1) l'expansion de la tumeur in vivo et (2) de la matière première pour les sphéroïdes.

Dans ce projet nous utiliserons 1010 souris Nude correspondant au nombre minimum d'animaux nécessaires pour une étude fiable des différents résultats, conformément à la règle des 3R :

Remplacer/réduire : Les tests in vitro sur sphéroïdes (dont la matière première est multipliée chez la souris in vivo) vont permettre de réduire le nombre de souris tout en obtenant des résultats pertinents.

Raffiner : Nous utiliserons des souris Balb/c Nude (ou NOD-SCID), permettant le développement de modèles tumoraux humains sans phénomène de rejet. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux, dans un environnement contrôlé dépourvu de pathogènes (les souris Balb/c nude seront hébergées dans des armoires ventilées à air filtré. Si nous avons besoins d'utiliser des souris NOD-SCID, des boîtes hermétiques à couvercle filtrant seront utilisé et le change sera effectué sous PSM). La croissance des tumeurs sous cutanées n'entraîne pas de gêne de mobilité et sera suivie de près. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux garantiront leur bien-être, et nous permettront d'intervenir immédiatement de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance.

8186 Depuis quelques années, on découvre que les bactéries du tube digestif jouent un rôle sur le comportement de l'hôte, ce qui a conduit à parler d'axe microbiote-intestin-cerveau. Par exemple, durant des tests d'anxiété ou des tests de mémoire, des rongeurs élevés sans bactéries dans un environnement stérile (animaux axéniques) exprimaient des comportements différents des rongeurs élevés normalement en présence de bactéries. Par ailleurs, les études réalisées chez l'Homme et les rongeurs montrent que le microbiote intestinal (MI) du jeune (microbiote intestinal initial) a une importance déterminante sur la composition du microbiote intestinal de l'adulte. Cependant, contrairement aux mammifères, les études sur le sujet manquent cruellement chez l'oiseau alors que l'amélioration du microbiote intestinal pourrait être une nouvelle voie d'amélioration de l'élevage des volailles.

En conséquence, nous formulons l'hypothèse que le microbiote intestinal initialement implanté dans le tube digestif de la caille japonaise a des conséquences à court et long terme sur ses comportements émotionnels, sa mémoire, ses réponses physiologiques au stress ainsi que sa neurogenèse (processus de création de nouveaux neurones). Une précédente expérience nous a montré que la supplémentation des cailles avec un probiotique, c'est-à-dire un micro-organisme favorable à la santé (bactérie ou levure) permettait d'augmenter la mémoire à court terme et modifiait la réactivité émotionnelle. Nous souhaitons continuer cette investigation sur les capacités de mémoire de la caille en interrogeant les capacités de mémoire spatiale, les réponses physiologiques au stress et les effets sur la neurogenèse. Comme dans la précédente expérience, dans une première expérience, nous allons utiliser une lignée de cailles sélectionnée pour sa forte réactivité émotionnelle pour former, dès la naissance, un lot de cailles témoins et un lot de cailles abreuvées avec de l'eau supplémentée avec la bactérie probiotique *Pediococcus acidilactici*. Dans une seconde étape, nous répéterons ce protocole en apportant cette fois, non plus un probiotique, mais un aliment enrichi en vitamines et en matières premières et sources d'énergie hautement assimilables (Acides gras poly-insaturés, glucose, concentré de soja, gluten, vitamines B, E, C, HyD) et ayant une action prébiotique (Oligosaccharides) supposée favoriser l'implantation du microbiote intestinal.

Dans chaque expérience, nous sexerons nos cailles à la naissance afin de n'utiliser que des femelles pour l'expérience et éviter des altercations violentes entre mâles.

La prise en compte de la règle des 3R se décline pour chaque expérience, par :

REPLACEMENT : compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude in vitro ou in silico.

REDUCTION : Nous ferons éclore 352 cailleaux au total et pour chaque expérience, après sexage, seules 36 femelles par traitement seront gardées (72 cailles dans chaque expérience). Avec cet

effectif, étant donné la variabilité des paramètres mesurant la mémoire que nous connaissons, nous pouvons espérer détecter une différence entre nos groupes. Le nombre d'animaux engagés dans ces expériences est donc défini pour tenir compte de la variabilité inter-individuelle des capacités cognitives obtenue lors d'expériences précédentes.

RAFFINEMENT : Les animaux seront élevés en cage sur copeaux. Un enrichissement sera apporté par l'apport lors de jours successifs d'objets nouveaux préalablement stérilisés. Les animaux resteront en groupe et seront visités deux fois par jour.

8187 La diversification des espèces de poissons élevées devient un enjeu majeur pour maintenir une pisciculture durable et respectueuse de l'environnement tout en répondant à la demande grandissante des consommateurs en produits aquatiques. Cette approche nécessite la domestication de nouvelles espèces dont le processus affecte les fonctions physiologiques des animaux, notamment leur reproduction. Chez la perche commune *Perca fluviatilis*, un programme photo-thermique permet de contrôler la production des gamètes (ovules et spermatozoïdes) en captivité (9 mois). Cependant, des défauts de développement embryonnaire sont encore observés (mortalité, apparition de malformations). Le but de ce travail est de comparer le succès de la reproduction (physiologie des géniteurs, composition moléculaire des œufs et développement des descendants) de deux populations de perche, l'une proche de l'état sauvage (parents prélevés dans la nature au stade embryonnaire puis élevés en captivité) et l'autre domestiquée depuis plusieurs générations qui seront soumises aux mêmes conditions expérimentales. En tout, 654 géniteurs seront étudiés car nous souhaitons obtenir un grand nombre de pontes à la fin de l'expérience afin de pouvoir étudier le plus précisément possible la diversité des défauts de développement rencontrés dans chaque population (réduction) qui sont souvent dus à une diminution de la qualité des gamètes chez les animaux d'élevage.

Au cours de ce projet 6 procédures seront mises en œuvre. Les 2 premières seront effectuées au début de l'expérience (pose d'une micro-puce électronique pour suivre individuellement les poissons, prélèvement d'un morceau de nageoire pour faire des analyses génétiques). Nous effectuerons 5 prélèvements de poissons (5 femelles et 1 mâle/bac/prélèvement) pendant la gonadogenèse (développement des organes reproducteurs) pour suivre le développement des gonades (organes reproducteurs) et le statut hormonal des poissons et ainsi comparer ce statut dans les deux populations lors de points clés de la gonadogenèse. Au troisième prélèvement, le sexe des poissons sera identifié par la méthode non invasive d'échographie pour minimiser les stress dans les manipulations et s'assurer de ne prendre que des femelles lors des prélèvements ultérieurs et respecter les principes de raffinement de la règle des 3Rs. Enfin lors du 5ème prélèvement, les ovocytes (ovules en développement) de toutes les femelles restantes seront prélevés pour regrouper les femelles qui ovuleront au même moment et éviter un stress important des poissons lors de la période de ponte (raffinement). Enfin, nous procéderons à la fin de l'expérience à des fécondations artificielles pour s'assurer du moment exact de la fécondation et donc de suivre le développement des embryons. Pour cela nous procéderons à des récoltes de pontes et de sperme chez les géniteurs au moment de l'ovulation. Dans le cadre de cette expérience, les points limites observés concernent la perte d'un comportement de nage exploratoire des individus dans le bassin, une perte de l'appétit et/ou l'apparition de nécroses au niveau des branchies, de la bouche, des nageoires et du flanc de l'animal.

Pour conclure, ce type d'étude ne peut être remplacé par des techniques *in vitro* (remplacement) qui ne pourraient pas prendre en compte l'intégration de toutes les dimensions de l'étude (physiologiques, moléculaires, embryologiques). Elle nous permettra (i) d'identifier les modifications physiologiques qui s'opèrent au cours de l'ovogenèse des géniteurs de chaque population (ii) de déterminer l'effet du niveau de domestication sur le succès de la reproduction et (iii) d'identifier des différences d'incorporation du matériel moléculaire entre les deux populations.

8188 Notre étude porte sur l'acquisition de connaissances de biologie fondamentale relatives aux différences anatomiques et physiologiques entre les sexes. En particulier, le cerveau est un organe dont de nombreuses structures et fonctions sont sexuellement différenciées entre mâles et femelles. Il existe par exemple un certain nombre de structures qui chez les rongeurs sont connues pour différer dans leur volume entre les sexes. Dans ce cadre, nous voulons réaliser une cartographie exhaustive

de ces régions sexuellement différenciées chez le mouton, un modèle animal de choix pour étudier la différenciation sexuelle du cerveau et des comportements associés.

Ainsi, nous voulons mesurer les différences neuro-anatomiques entre les sexes. Nous comptons imager, lors de la saison sexuelle, un groupe de brebis et un groupe de béliers adultes intacts puis gonadectomisés (afin d'éliminer l'effet des hormones sexuelles adultes qui diffèrent entre mâles et femelles) puis sous stimulation hormonale de testostérone pour mesurer la réponse du cerveau des deux sexes à un challenge hormonal identique à l'âge adulte.

Les approches d'imagerie, qui constituent des approches très peu invasives, nous permettent de mesurer les différences entre les sexes sans à priori, sur l'ensemble des structures cérébrales et de manière longitudinale.

En termes d'application, la compréhension des différences biologiques entre les sexes est une question avec des répercussions majeures par exemple en termes de santé publique. En effet, il existe un grand nombre de pathologies qui varient en fonction des sexes. Malheureusement, la plupart des traitements médicamenteux existant à l'heure actuelle ont été validés pour les hommes sans considération pour la physiologie féminine. Comprendre, sur des modèles animaux précliniques, ces différences inter sexes est donc de la plus haute importance dans le domaine préclinique.

Ce protocole respecte la règle des 3Rs car :

1/ Réduction : le nombre d'animaux a été limité au minimum (N=30, soit 15 mâles et 15 femelles) pour obtenir des effets significatifs

2/ Remplacement : il n'existe pas d'alternative au recours à l'expérimentation animale pour étudier un mécanisme biologique aussi intégré

3/ Raffinement : la méthode utilisée, reposant sur l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est peu invasive et permet un suivi longitudinal des animaux. De plus, elle permet de réduire le nombre d'animaux en comparaison des approches histologiques habituelles.

8189 Ce projet s'attache à comprendre le rôle dans l'inflammation d'une protéine X, et plus particulièrement comprendre ses fonctions dans les neutrophiles, cellules appartenant à la famille des globules blancs.

L'inflammation est une réponse non spécifique de l'organisme permettant l'élimination et la destruction de toute substance étrangère. Mais si celle-ci peut parfois être dérégulée et être responsable d'effets délétères. La protéine X s'est révélée au cours de ces années être impliquée dans certaines pathologies inflammatoires. Pourtant son rôle dans l'inflammation n'a encore jamais été étudié. Nous souhaitons donc comprendre quels rôles joue-t-elle dans l'inflammation et en particulier son rôle dans les neutrophiles, véritables cellules immunitaires sentinelles de notre organisme.

En vue de réaliser ce projet, nous souhaiterions étudier un total de 130 souris, dans lequel deux modèles inflammatoires pulmonaires et péritonéaux seront mis en place chez des souris sauvages et des souris génétiquement modifiées déficientes pour la protéine X. Ces inflammations se font pendant une durée limitée de 4h, permettant le recrutement de globules blancs mais assez courte pour éviter et limiter les souffrances de l'animale qui sera euthanasié à la fin des procédures. Nous étudierons également si le recrutement des neutrophiles entre souris sauvages ou déficientes pour cette protéine est différent à la paroi des vaisseaux sanguins après une inflammation.

Le but étant d'étudier et de comprendre comment les neutrophiles réagissent en présence ou en absence de cette protéine dans un contexte inflammatoire.

Cet objectif ne peut être atteint que par des techniques *in vivo*, du fait de la complexité des mécanismes physiologiques mis en jeu lors de l'inflammation. Cependant, ce projet est complété par des approches mécanistiques en culture cellulaire.

Le nombre d'animaux nécessaires a été consciencieusement calculé de manière à ce que les analyses statistiques soient fiables tout en diminuant au maximum le nombre d'animaux utilisés pour chaque procédure expérimentale.

Afin d'éviter toute souffrance animale, les réactions inflammatoires se font pendant une durée limitée de 4 heures, et les souris sont euthanasiées à la fin des procédures afin d'éviter tout signe de sepsis.

De plus afin de limiter tout stress éventuel, les cages seront équipées de matériel de nidification et les souris seront placées avec leur congénères, avec eau et nourriture ad libitum. De plus elles feront l'objet d'une surveillance accrue, si jamais un signe de souffrance, tel qu'un poil ébouriffé, des yeux plissés et une prostration au fond de la cage, est observé, alors les souris seront euthanasiés.

A terme, ces résultats permettront donc de mieux comprendre les mécanismes inflammatoires, permettant peut-être dans l'avenir le développement d'agents thérapeutiques impliquant la protéine que nous étudions.

8190 Les rétinopathies pigmentaires (RP) sont un ensemble de maladies génétiques pour lesquelles il n'existe actuellement aucun traitement. On évalue à 30.000 le nombre de patients atteints de RP en France et 1.5 million dans le monde. Cette maladie est caractérisée par la perte progressive des photorécepteurs et le dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire, associés à des dépôts pigmentaires visibles au fond d'œil. Il n'existe à ce jour aucun traitement pour cette maladie.

Le fer est un élément essentiel dans la physiologie rétinienne, mais il contribue également à une dégénérescence rétinienne causée par un stress oxydatif.

La transferrine, est un chélateur puissant du fer, elle pourrait être un bon traitement comme anti apoptotique dans un modèle de RP.

La thérapie génique est l'une des stratégies possible pour assurer une production continue et à long terme d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non virale par électro-transfert dans le muscle ciliaire permettant l'expression de la transferrine.

L'objectif de nos études est de déterminer l'effet neuro-protecteur de la transferrine dans un modèle rongeur de dégénérescence rétinienne induite par injection intra-péritonéale de MNU. L'ensemble du projet nécessitera 546 rats. L'utilisation d'une procédure expérimentale standardisée sur les deux yeux, comportant l'ensemble des étapes a été mise au point afin de pouvoir réduire de façon importante le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables. Dans le cadre de la règle des 3R, le modèle MNU est le seul modèle expérimental permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées sous anesthésie générale. Des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

8191 Les septicémies à *E. coli* sont un problème majeur de santé publique. L'incidence du sepsis augmente ainsi que les morts associées, le plaçant parmi les dix causes de mort principales. *E. coli* est parmi les bactéries les plus impliquées, représentant le premier germe dans les septicémies communautaires et le 4ème agent nosocomial. La mortalité des septicémies en France est de 13%. De plus, les souches deviennent de plus en plus résistantes aux antibiotiques, ce qui va augmenter la morbidité et la mortalité de cette infection. Il est donc fondamental de mieux comprendre la physiopathologie de ces infections afin de mieux les traiter voire les prévenir.

Un modèle de septicémie à *E. coli* chez la souris a été développé en 1999. Ce modèle a fait l'objet de nombreuses publications dans des journaux internationaux à comité de lecture. Une équipe américaine et une équipe espagnole l'utilisent maintenant couramment. Ces développements ont également fait l'objet de publications dans des journaux à comité de lecture. Ce modèle a déjà permis de faire des avancées considérables dans la compréhension de la physiopathologie des septicémies à *E. coli* en montrant que seule certaines souches de *E. coli* sont capables de tuer les souris. Ce modèle a permis d'identifier des gènes associés à la mortalité qui sont autant de cibles potentielles pour de nouvelles approches thérapeutiques. Toutefois, de nombreuses questions demeurent encore et l'obtention de génomes complets de bactéries va permettre d'utiliser le modèle afin de décortiquer les mécanismes de virulence.

Il sera utilisé 4000 souris sur 5 ans, ce qui correspond à 350 souches (10 souris inoculées par souche) avec les contrôles dans chaque série d'expériences.

Le projet expérimental est conforme aux exigences de réduction, de raffinement et de remplacement (« règle des 3 R »). En effet :

Réduction. Afin de réduire le nombre d'animaux nous injectons 10 souris par souche. De nombreuses études antérieures montrent que ce chiffre minimal permet d'avoir des résultats statistiquement significatifs. Cette puissance statistique évite donc des expérimentations animales non concluantes. Étant donné l'extrême polymorphisme génétique à l'intérieur de l'espèce *E. coli*, un nombre de 300 isolats naturels peut être considéré comme représentatif de l'espèce. Les 50 souches supplémentaires correspondent à des mutants sur les gènes candidats identifiés et leurs contrôles. De plus, ce modèle est le plus utilisé dans la littérature internationale et représente un moyen reconnu par l'ensemble de la communauté scientifique de mesurer la virulence extra-intestinale intrinsèque des souches de *E. coli*. Cela permet de faire des comparaisons inter-laboratoires, évitant les répétitions et donc l'utilisation d'animaux supplémentaires.

Raffinement. Le raffinement est obtenu grâce au respect d'un délai d'au moins 48-72h entre l'arrivée des souris au laboratoire et le début de l'expérimentation animale, le respect des conditions optimales d'hébergement des souris (5 à 10 souris par cage) sur une durée maximum 7 jours après l'inoculation.

Dans la mesure où ce modèle représente un modèle sévère d'infection bactérienne systémique avec signes de sepsis entraînant une mortalité spontanée qui peut aller jusqu'à 100% en 24 h, nous avons établi des points limites strictement définis à partir d'une échelle de score clinique, lors d'une surveillance 3 fois par jour, pour déterminer le moment où il est opportun d'euthanasier l'animal.

Remplacement. La complexité de la physiopathologie du sepsis à *E. coli*, avec une réponse complexe de l'hôte, rend pour l'instant le remplacement de ce modèle expérimental par des modèles *in vitro* ou *in silico* non réalisable.

8192 Depuis de très nombreuses années, des pullulations de campagnols terrestres causent des dégâts considérables dans les régions d'élevage (*Arvicola terrestris* et *Microtus arvalis*), céréalières (*Microtus arvalis*) ou d'arboriculture (*Microtus duodecimcostatus*), tout particulièrement en Auvergne. Les pullulations de campagnols sur prairies (*Arvicola terrestris* et *Microtus arvalis*) ont des conséquences directes sur la qualité et la quantité d'herbe et des fourrages. Des enquêtes réalisées en Franche Comté indiquent des pertes annuelles de 30 à 80 % selon les parcelles concernées. Le campagnol provençal (*Microtus duodecimcostatus*) est omniprésent dans les vergers et cultures maraîchères dans sa zone de répartition méridionale. Les dégâts ne sont pas systématiques mais peuvent aller jusqu'à la perte d'arbres ou de la culture en place. En raison des dégâts occasionnés par les campagnols et du potentiel risque sanitaire associé (plus de 40 pathogènes zoonotiques potentiels) à leur pullulation, il est nécessaire de contrôler les populations de campagnols terrestres. Ce contrôle repose sur des approches sanitaires, sur des pratiques agricoles adaptées et écologiques intégrées et sur l'utilisation de rodenticides. Parmi les rodenticides anticoagulants, seule la bromadiolone est homologuée en France pour l'usage phytosanitaire (cf. arrêté campagnols). Malgré un contrôle strict de son utilisation, son utilisation en plein champ peut aboutir à des mortalités de rapaces (milans, buses, chouettes, gypaètes, etc.) ou de mammifères prédateurs (renards, mustélidés, félidés, sangliers...) en raison de sa très longue rémanence tissulaire dans l'organisme du campagnol. De nouvelles molécules rodenticides efficaces et écocompatibles sont donc nécessaires pour contrôler les populations de campagnols. L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité et la sécurité de nouvelles molécules pour le contrôle des populations de campagnols. Un premier screening des molécules sera effectué *in vitro* par détermination de leur pouvoir inhibiteur sur leur cible protéique, après expression de cette dernière en système levures. Ceci permettra d'écarter les molécules non actives. Néanmoins, l'efficacité de ces molécules dépend également de la distribution de la molécule au niveau du tissu cible. Seule l'expérimentation *in vivo* chez les espèces cibles permettra de caractériser la distribution tissulaire des nouvelles molécules (donc leur efficacité) ainsi que leur rémanence (donc leur écotoxicité), aucun test *in vitro* ne permettant pour le moment de caractériser le métabolisme de telles molécules chez le campagnol. Les espèces cibles sont le campagnol terrestre (*Arvicola terrestris*), le campagnol des champs (*Microtus Arvalis*) et le campagnol provençal (*Microtus duodecimcostatus*), l'utilisation de ces animaux nécessitant l'obtention préalable d'une dérogation à l'article R 214-92 pour prélèvement d'animaux sauvages non-captifs.

Ces tests seront réalisés selon les normes réglementaires imposées par la France. Un minimum de 10 animaux par groupe sera requis pour évaluer un produit tout en ayant un test avec une puissance statistique satisfaisante. C'est donc le nombre d'animaux minimum nécessaire pour obtenir le résultat.

Sur 5 ans, nous envisageons d'utiliser 2000 campagnols, pour nous permettre d'évaluer 40 nouvelles molécules.

Les animaux seront conservés dans les conditions satisfaisantes pour leur bien-être et leurs besoins sociaux. Les manipulations seront effectuées par un personnel spécialisé et qualifié afin de limiter au maximum le stress et la souffrance causée par les tests. Tout sera mis en œuvre pour éviter que les expériences mènent à une souffrance trop importante (administration de l'antidote en préventif lorsque cela est possible, suivi clinique attentif pour détecter les points limites qui seront dans le cas d'une molécule anticoagulante tous les signes liés à un état hémorragique (prostration, poil hérissé)) et, lorsque l'efficacité des produits sera prouvée, l'animal sera endormi et euthanasié pour éviter que la mort soit la fin de l'expérience.

8193 Ce projet a pour but de caractériser par imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) la fibrose interstitielle dans le muscle cardiaque.

Le processus fibrotique fait partie de la physiopathologie dans un certain nombre de pathologies affectant les muscles cardiaque et squelettiques.

La fibrose musculaire est un aspect particulièrement important des dystrophies musculaires dans la mesure où elle conditionne largement les capacités contractiles des muscles. Par ailleurs, elle est le seul paramètre pathologique à avoir une corrélation significative avec le pronostic des patients, comme l'âge de perte de la marche.

La fibrose myocardique fait suite à une lésion aiguë ou chronique et compense d'une certaine façon la perte de substance avec une augmentation de la matrice extracellulaire par la production excessive de collagène et glycoprotéines par les fibroblastes. Il en résulte une désorganisation de l'architecture du tissu cardiaque. D'un point de vue fonctionnel, la fibrose entraîne essentiellement une altération de la contraction longitudinale et axiale par désorganisation des fibres musculaires ; mais aussi une augmentation de la rigidité myocardique par altération de la relaxation et de la compliance myocardique, et des troubles de conduction et du rythme.

L'impact de la fibrose en terme de pronostic est par ailleurs largement démontré dans un grand nombre de cardiomyopathies, ischémiques ou non ischémiques. Faire le diagnostic de la fibrose myocardique représente donc un intérêt majeur, d'autant plus que certaines options thérapeutiques peuvent être proposées.

L'échocardiographie permettra d'évaluer la masse ventriculaire gauche et sa fonction contractile. L'IRM trouve une place complémentaire intéressante à côté de l'échographie pour préciser la distribution d'une hypertrophie, pour quantifier la masse du ventricule gauche (VG) et surtout pour révéler des possibles plages de rehaussement tardif après injection de Gadolinium qui traduisent des foyers de fibrose ou de nécrose tissulaire - ce qui ne peut être objectivé par aucune autre méthode diagnostique.

L'objectif principal de ce projet est de développer des outils de RMN pour une évaluation atraumatique de la fibrose musculaire cardiaque in vivo.

Pour disposer d'un modèle cliniquement pertinent, avec des niveaux de fibrose myocardique chez le rat, similaires à ceux observés dans des patients, les animaux seront soumis à une intervention de constriction (banding) de l'aorte ascendante, puis un debanding aboutissant à une levée d'obstacle à l'éjection. Le banding de l'aorte induit un mécanisme d'hypertrophie myocardique associée à une fibrose interstitielle, puis le debanding permet la régression de l'hypertrophie et le maintien d'un certain degré de fibrose.

Un total de 36 rats Wistar est prévu pour ce projet, qui devrait d'étendre sur un période allant jusqu'à 5 ans. Ce nombre d'animaux a été défini en appliquant la règle des 3R : réduire, raffiner, et remplacer.

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 (2 mois), les variations hormonales (femelles) et les variations sanitaires (un seul fournisseur).

Le raffinement avant l'expérimentation sera fait par l'enrichissement de l'environnement et par l'élevage des animaux 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.

8194 L'obésité et sa complication majeure, le diabète de type 2, représentent un réel problème de santé publique. Le diabète de type 2 se définit par une insuffisance ou un manque de sécrétion d'insuline par les cellules beta des îlots pancréatiques en réponse au glucose sanguin. Cette maladie se caractérise par une inflammation au sein même des îlots avec notamment l'accumulation de cellules immunitaires innées (les macrophages) pro-inflammatoires qui participent à la défaillance des cellules beta. De manière intéressante, des cellules immunitaires bénéfiques résident également dans les îlots à l'état physiologique (soit non diabétique) et contribuent à une bonne sécrétion d'insuline. Ainsi, l'objectif de ce projet de recherche est d'investiguer si l'immunité locale des îlots joue un rôle essentiel dans les réponses adaptatives des cellules beta à des conditions de stress métabolique demandant une production accrue d'insuline. Dans ce but, deux modèles connus pour induire un stress métabolique (un surplus d'énergie avec un régime gras et l'étape du sevrage) seront testés chez des souris sauvages C57BL/6J et des souris transgéniques ne possédant pas certaines populations immunitaires d'intérêt (les macrophages exprimant IRF5 ou les cellules innées lymphoïdes de type 2 appelées ILC2) ou leurs facteurs d'activation (souris n'exprimant pas la cytokine interleukine (IL)-33 dans les cellules endothéliales ou endocrines). En effet, des données préliminaires démontrent l'expression d'IRF5 dans les macrophages des îlots et une augmentation de l'expression d'IL-33 dans les îlots de souris sevrées comparées aux souris allaitantes.

Afin de permettre une caractérisation complète et statistiquement robuste de nos modèles, des groupes de 10 à 40 souris seront utilisés avec un nombre total d'animaux utilisés de 2000 (soit 1000 souris par sexe), correspondant à deux modèles de stress métabolique (le sevrage et le régime riche en graisses), chez cinq modèles murins sauvage ou transgéniques à la fois chez le mâle et chez la femelle. La recherche animale est indispensable pour cette étude. Les modèles murins choisis permettront de mettre en évidence si certaines cellules immunitaires aident les îlots pancréatiques à faire face aux besoins physiologiques du corps en insuline et pourraient déboucher sur la découverte de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement du diabète, la maladie d'une sécrétion d'insuline insuffisante.

De plus, il faut savoir que l'étude des îlots pancréatiques est techniquement très compliquée. Considérant que les îlots ne seront pas correctement isolés chez environ 20% des souris, un nombre suffisant d'animaux est nécessaire. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée. Tout d'abord, les animaux seront acclimatés à l'animalerie au moins une semaine avant le début de chaque expérience et seront habitués à être manipulés avec un suivi de poids au moins hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Les étapes du sevrage et du régime riche en graisses choisies dans ce projet ne représentent pas de stress particulier pour les animaux. De plus, pour les études cellulaires, les modèles murins seront remplacés par des lignées cellulaires de cellules beta. Enfin, ces souris seront utilisées pour plusieurs projets dans l'équipe de recherche (par exemple l'étude en parallèle des tissus adipeux et du foie) afin de réduire le nombre total de souris sous expérimentation.

8195 L'obésité et sa complication majeure, le diabète de type 2, représentent un réel problème de santé publique. Le diabète de type 2 se définit par une insuffisance ou un manque de sécrétion d'insuline par les cellules beta des îlots pancréatiques en réponse au glucose sanguin. Cette maladie se caractérise par une inflammation au sein même des îlots avec notamment l'accumulation de cellules immunitaires innées (les macrophages) pro-inflammatoires qui participent à la défaillance des cellules beta. De manière intéressante, des cellules immunitaires bénéfiques résident également dans les îlots à l'état physiologique (soit non diabétique) et contribuent à une bonne sécrétion d'insuline.

Ainsi, l'objectif de ce projet de recherche est d'investiguer si l'immunité locale des îlots joue un rôle essentiel dans les réponses adaptatives des cellules beta à des conditions de stress métabolique demandant une production accrue d'insuline. Dans ce but, deux modèles connus pour induire un stress métabolique (un surplus d'énergie avec un régime gras et l'étape du sevrage) seront testés chez des souris sauvages C57BL/6J et BALB/c. Certaines de ces souris seront traitées avec un

anticorps neutralisant ou une cytokine recombinante afin d'influencer le nombre et la nature des cellules immunitaires.

Afin de permettre une caractérisation complète et statistiquement robuste de nos modèles, le nombre total d'animaux utilisés sera de 1700 (soit 850 souris par sexe), correspondant à deux modèles de stress métabolique (le sevrage et le régime riche en graisses), à la fois chez le mâle et chez la femelle. La recherche animale est indispensable pour cette étude. Les modèles murins choisis permettront de mettre en évidence si certaines cellules immunitaires aident les îlots pancréatiques à faire face aux besoins physiologiques du corps en insuline et pourraient déboucher sur la découverte de nouvelles voies thérapeutiques pour le traitement du diabète, la maladie d'une sécrétion d'insuline insuffisante.

De plus, il faut savoir que l'étude des îlots pancréatiques est techniquement très compliquée. Considérant que les îlots ne seront pas correctement isolés chez environ 20% des souris, un nombre suffisant d'animaux est nécessaire. La stratégie des 3R (réduire, raffiner, remplacer) sera respectée. Tout d'abord, les animaux seront acclimatés à l'animalerie au moins une semaine avant le début de chaque expérience et seront habitués à être manipulés avec un suivi de poids au moins hebdomadaire qui permet, en plus des données expérimentales, de s'assurer du bon état de santé des animaux. Les étapes du sevrage et du régime riche en graisses choisies dans ce projet ne représentent pas de stress particulier pour les animaux. De plus, pour les études cellulaires, les modèles murins seront remplacés par des lignées cellulaires de cellules beta. Enfin, ces souris seront utilisées pour plusieurs projets dans l'équipe de recherche (par exemple l'étude en parallèle des tissus adipeux et du foie) afin de réduire le nombre total de souris sous expérimentation.

8196 Ce projet a pour but de caractériser par imagerie par Résonance Magnétique Nucléaire (RMN) la fibrose interstitielle dans le muscle cardiaque.

Le processus fibrotique fait partie de la physiopathologie dans un certain nombre de pathologies affectant les muscles cardiaque et squelettiques.

La fibrose musculaire est un aspect particulièrement important des dystrophies musculaires dans la mesure où elle conditionne largement les capacités contractiles des muscles. Par ailleurs, elle est le seul paramètre pathologique à avoir une corrélation significative avec le pronostic des patients, comme l'âge de perte de la marche.

La fibrose myocardique fait suite à une lésion aiguë ou chronique et compense d'une certaine façon la perte de substance avec une augmentation de la matrice extracellulaire par la production excessive de collagène et glycoprotéines par les fibroblastes. Il en résulte une désorganisation de l'architecture du tissu cardiaque. D'un point de vue fonctionnel, la fibrose entraîne essentiellement une altération de la contraction longitudinale et axiale par désorganisation des fibres musculaires ; mais aussi une augmentation de la rigidité myocardique par altération de la relaxation et de la compliance myocardique, et des troubles de conduction et du rythme.

L'impact de la fibrose en termes de pronostic est par ailleurs largement démontré dans un grand nombre de cardiomyopathies, ischémiques ou non ischémiques. Faire le diagnostic de la fibrose myocardique représente donc un intérêt majeur, d'autant plus que certaines options thérapeutiques peuvent être proposées.

L'IRM trouve une place complémentaire intéressante à côté de l'échographie pour préciser la distribution d'une hypertrophie, pour quantifier la masse du ventricule gauche (VG) et surtout pour révéler des possibles plages de rehaussement tardif qui traduisent des foyers de fibrose ou de nécrose tissulaire - ce qui ne peut être objectivé par aucune autre méthode diagnostique.

L'objectif principal de ce projet est donc de développer des outils de RMN pour une évaluation atraumatique de la fibrose musculaire cardiaque in vivo.

Pour disposer d'un modèle cliniquement pertinent, avec des niveaux de fibrose myocardique chez le rat, similaires à ceux observés dans des patients, les animaux (rats) seront soumis à une intervention chirurgicale afin de réaliser une constriction (banding) de l'aorte thoracique ascendante, puis un debanding quelques semaines plus tard (la constriction de l'aorte est enlevée) aboutissant à une levée d'obstacle à l'éjection. Le banding de l'aorte induit un mécanisme d'hypertrophie myocardique

associée à une fibrose interstitielle, puis le debanding permet la régression de l'hypertrophie mais le maintien d'un certain degré de fibrose.

Un total de 36 rats Wistar est prévu pour ce projet, qui devrait s'étendre sur une période allant jusqu'à 5 ans. Ce nombre d'animaux a été défini en appliquant la règle des 3R : réduire, raffiner, et remplacer.

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 (2 mois), les variations hormonales (femelles) et les variations sanitaires (un seul fournisseur).

Le raffinement avant l'expérimentation sera fait par l'enrichissement de l'environnement et par l'élevage des animaux 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.

8197 Les rétinoopathies pigmentaires se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs et un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire rétinien, elles regroupent un ensemble hétérogène de pathologies oculaires. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace.

Les cellules de la microglie participent au maintien de l'intégrité de la rétine ; toutefois, il existe un lien entre leur activation avec la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et les pathologies neurodégénératives, dont les rétinoopathies pigmentaires.

La thérapie génique est l'une des stratégies possibles pour assurer une production continue et à long terme d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non virale par électro-transfert dans le muscle ciliaire permettant l'expression ciblée et à continue d'un anti-TNF-alpha, appelée Protéine 6, qui limiterait l'excès intraoculaire de TNF-alpha. Il n'existe pas de modèle in vitro représentatif de la dégénérescence des photorécepteurs

L'objectif de nos études est de déterminer l'effet neuro-protecteur de la Protéine 6 dans un modèle génétique de dégénérescence rétinienne. L'ensemble du projet nécessitera 524 rats. L'utilisation d'une procédure expérimentale standardisée sur les deux yeux, comportant l'ensemble des étapes a été mise au point afin de pouvoir réduire de façon importante le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Dans le cadre de la règle des 3R, le RCS est un modèle de dégénérescence rétinienne permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées sous anesthésie générale. Des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

8198 De nombreux cancers impliquent le recours à la chirurgie comme traitement de référence. L'action du chirurgien est alors décisive pour la survie et la qualité de vie du patient. Toutefois, les résultats obtenus restent conditionnés par l'élimination totale de l'ensemble des tumeurs. Pour faciliter la détection des tissus tumoraux dont certains sont difficilement détectables à l'œil nu, et donc en faciliter l'ablation par le chirurgien, la chirurgie guidée par l'imagerie de fluorescence se révèle prometteuse. Cette technique, qui implique l'administration d'un produit fluorescent, appelé traceur, marquant préférentiellement les tumeurs permettrait d'augmenter les chances de succès de l'opération. En effet, le chirurgien pourrait réaliser l'ablation de tous les amas fluorescents à forte probabilité cancéreuse tout en préservant les tissus sains. Actuellement, le traceur fluorescent le plus utilisé en clinique est le vert d'indocyanine mais il possède certains inconvénients qui limitent son utilisation en chirurgie tels que la perte rapide de fluorescence et une spécificité médiocre vis-à-vis des tissus cancéreux. Aussi, lors d'une chirurgie longue comme c'est le cas pour l'ablation de tumeurs multiples dans le péritoine (carcinomatose péritonéale), ce traceur n'est pas adapté. Nous proposons d'évaluer in vivo un nouveau type de traceur possédant une fluorescence intense et stable et une spécificité accrue pour les tumeurs. En trois ans, on estime que 3 compositions chimiquement différentes de ce nouveau traceur testées in vitro pourraient être évaluées in vivo. La voie d'injection du traceur étant un élément important car la voie intraveineuse peut favoriser l'accumulation du traceur dans les tumeurs mais aussi dans le foie et dans la rate alors que la voie intra-péritonéale peut maintenir une concentration élevée du traceur dans la cavité péritonéale, on déterminera chez sur la souris porteuse d'une

carcinomatose péritonéale d'origine ovarienne humaine la voie d'injection du traceur, intraveineuse ou intra-péritonéale, pour laquelle la captation du traceur par les tumeurs donnera une image de fluorescence optimale. Les séances d'imagerie de l'animal endormi (durée : 10 minutes) seront réalisées à différents temps : 0 (avant injection l'image est réalisée pour obtenir une image témoin) puis 5 min, 1/2h, 1h, 2h, 4h, 6h, 48h et 72h) après l'injection du traceur. Le temps 24h après injection ne peut être fait sur le même animal du fait de la nécessité de le priver de nourriture 12h avant la séance d'imagerie pour éviter une fluorescence parasite dans le foie. De ce fait, un deuxième lot d'animaux sera imagé à 24h et 48h après injection du traceur (le temps 48h permettra de vérifier la conformité de l'image obtenue avec celle du premier lot). A l'issue de la dernière séance (soit à 72h pour le premier lot et à 48h après injection pour le deuxième lot), les animaux sont euthanasiés. Une étude de biodistribution sera ensuite effectuée pour laquelle les animaux seront injectés en intraveineux ou en intra-péritonéal, imagés puis euthanasiés pour le prélèvement des organes et des tumeurs. Le groupe témoin recevra seulement du sérum physiologique. Les organes prélevés seront analysés ultérieurement (études biochimiques et histologiques).

Avantages : L'imagerie du petit animal in vivo est indolore et non invasive (pas de chirurgie) et peut être réalisée sur le même animal pendant plusieurs jours.

Domages : Privation de nourriture (mais pas de boisson) pendant 18h maximum ; les séances d'imagerie répétitives ; les gestes invasifs consistant en l'injection intra-péritonéale des cellules cancéreuses pour induire une carcinomatose péritonéale, et en l'injection intra-péritonéale ou intraveineuse du traceur.

Type d'animal : souris immunodéprimée NMRI nude permettant l'implantation de tumeur d'origine humaine.

Nombre d'animaux : 432 souris maximum. A savoir, 48 souris pour l'imagerie seule (8 souris par type de nanoparticule et par voie d'injection). Puis 384 souris maximum pour l'étude imagerie suivie de la biodistribution.

Remplacement : des études préliminaires sur cellules cancéreuses en culture sont systématiquement effectuées avant le passage in vivo. Un modèle tridimensionnel de type sphéroïde multicellulaire représentatif d'une microtumeur non vascularisée est utilisé pour être plus proche de la situation in vivo. L'approche in vitro permet de définir le potentiel de la nanoparticule pour être administrée in vivo (toxicité, affinité vis-à-vis des cellules cancéreuses entre autres).

Réduction : Les animaux euthanasiés à l'issue de la procédure d'imagerie seule serviront pour l'étude de biodistribution. Pour l'analyse statistique appliquée à la biodistribution, on adoptera une démarche séquentielle. Les groupes seront composés au départ de 4 animaux (nombre souvent suffisant pour les groupes témoins). Si moins de 3 animaux sur 4 seront cohérents, on rajoutera jusqu'à 4 animaux par groupe si nécessaire. Le nombre d'animaux est ainsi ramené à 192 pour la biodistribution si 4 souris suffisent. De plus, si l'une des voies d'injection (intra-péritonéale ou intravasculaire) se révèle nettement supérieure à l'autre lors de l'imagerie, l'étude imagerie/biodistribution se fera uniquement à partir de cette voie donc sur 96 souris minimum (192 maximum), ce qui fera un nombre total de souris de 144 (240 maximum).

Raffinement : Enrichissement du milieu pour permettre l'enfouissement et la nidification ; anesthésie gazeuse sous masque lors des séances d'imagerie durant lesquelles la souris est maintenue au chaud ; points limites établis par le calcul d'un score à partir de 3 critères sur l'apparence, 4 critères sur le comportement naturel, 4 critères sur le comportement provoqué et 5 critères sur l'état corporel lors de la progression des tumeurs abdominales. En dessous du score, les animaux sont euthanasiés. Il en est de même s'il y a apparition d'ascite dans le péritoine.

8199 De nombreuses affections neuropsychiatriques, telles que la dépression, la schizophrénie, la maladie de Parkinson et l'addiction aux drogues d'abus sont liées à une dérégulation du fonctionnement des neurones à dopamine (l'un des principaux neurotransmetteurs) dans le cerveau. D'autre part, il est bien connu que les neurones à sérotonine (un autre neurotransmetteur) modulent l'activité des neurones à dopamine, et les récepteurs de la sérotonine sont actuellement considérés comme des cibles pharmacologiques intéressantes pour le traitement de ces pathologies. Dans ce contexte, des études récentes soulignent le potentiel d'un des récepteurs de la sérotonine, appelé récepteur 5-

HT2B. Ainsi, les composés empêchant le fonctionnement de ce récepteur sont actuellement considérés comme des outils pharmacologiques prometteurs pour le développement de nouveaux traitements des affections liées à un dysfonctionnement des neurones à dopamine, notamment la schizophrénie et l'addiction à la cocaïne. De plus, les médicaments actuellement utilisés pour le traitement de la schizophrénie demeurent perfectibles en termes d'effets secondaires, et l'addiction à la cocaïne, une des drogues les plus consommées au monde, reste sans traitement efficace à ce jour. L'exploration du rôle du récepteur 5-HT_{2B} au sein du système nerveux central n'étant qu'à ses débuts, ce projet, suite naturelle des études déjà réalisées au laboratoire, vise à élargir et approfondir les connaissances actuelles concernant son influence sur l'activité des neurones à dopamine, mais aussi à sérotonine, au sein du cerveau. Ceci permettra d'étayer son potentiel pour le développement de nouveaux traitements des affections mentionnées ci-dessus. La réalisation de ce projet repose sur une approche combinant des techniques immuno-histochimique et biochimiques, comme la micro-dialyse intracérébrale permettant de mesurer l'activité des neurones à dopamine et à sérotonine chez l'animal vigile ou anesthésié. Les expériences seront réalisées chez le rat mâle, une espèce qui sert de modèle de référence dans toutes les études déjà publiées dans ce domaine de recherche. Des expériences seront aussi réalisées chez la souris mâle non génétiquement modifiée pour une comparaison directe avec les résultats actuellement disponibles dans la littérature. Nous estimons le nombre d'animaux nécessaire à un maximum de 1200 rats (1000 ± 200) et 86 souris (72 ± 14) sur 5 ans.

En effet, à l'heure actuelle, il n'est pas possible de remplacer l'expérimentation animale par des approches alternatives dans ce domaine d'études, la complexité du système nerveux ne permettant pas sa reproduction *in vitro*. Le cerveau des mammifères est constitué par un très grand nombre de noyaux interconnectés en réseaux et regroupant plusieurs milliards de neurones différents distants les uns des autres. Or, notre étude nécessite la visualisation et l'intégrité des réseaux englobant différentes régions du cerveau, ce qui rend impossible l'utilisation de coupes de tissus ou de cultures de cellules. Par ailleurs, il n'est actuellement pas possible d'utiliser des modèles *in silico*, puisque le fonctionnement même de l'organe n'est précisément pas connu. En revanche, tous les efforts seront portés afin de réduire le nombre d'animaux utilisés : les nombres indiqués ci-dessus correspondent aux valeurs minimales permettant un traitement statistique approprié. De même, une attention particulière sera portée aux méthodes de raffinement de l'étude, afin de préserver au mieux le bien-être des animaux durant les procédures. Ainsi, l'observation des animaux et de leurs conditions d'hébergement, en particulier lors des périodes post-chirurgicales, sera effectuée quotidiennement. De plus, des traitements appropriés (anesthésie, anti-inflammatoire, antidouleur) seront utilisés pour réduire la douleur associée aux opérations chirurgicales.

8200 Les rétinopathies pigmentaires se caractérisent par une perte progressive des photorécepteurs et un dysfonctionnement de l'épithélium pigmentaire rétinien, elles regroupent un ensemble hétérogène de pathologies oculaires. Il n'existe à ce jour aucun traitement efficace.

Le fer est un élément essentiel dans la physiologie rétinienne, mais il contribue également à une dégénérescence rétinienne causée par un stress oxydatif.

La Transferrine, est un puissant chélateur du fer, elle pourrait être un bon traitement comme anti-apoptotique dans les rétinopathies pigmentaires.

La thérapie génique est l'une des stratégies possibles pour assurer une production continue et à long terme d'une protéine thérapeutique. Nous avons donc développé une thérapie non virale par électro-transfert dans le muscle ciliaire permettant l'expression intraoculaire de la Transferrine.

L'objectif de nos études est de déterminer l'effet neuro-protecteur de la Transferrine dans un modèle rongeur de dégénérescence rétinienne induite par une exposition lumineuse intense et contrôlée (Light Induced Degenerescence). L'ensemble du projet nécessitera 420 rats. L'utilisation d'une procédure expérimentale standardisée sur les deux yeux, comportant l'ensemble des étapes a été mise au point afin de pouvoir réduire de façon importante le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables.

Dans le cadre de la règle des 3R, le modèle LID est un modèle expérimental de dégénérescence rétinienne permettant de démontrer l'efficacité de notre technologie. La mise en place *in vitro* de culture de cellules du muscle ciliaire permettant d'appliquer les conditions électriques de l'électro-

transfection identiques à celles utilisées in vivo est particulièrement compliquée. Il n'existe par ailleurs pas de modèle in vitro représentatif de la dégénérescence des photorécepteurs. Les procédures mises en place pour réaliser le projet sont peu traumatiques, de courte durée et sont réalisées pour la plupart sous anesthésie générale. Les procédures susceptibles d'engendrer de la douleur et du stress sont réalisées sous anesthésie générale. La procédure d'électro-transfection est standardisée sur les deux yeux afin de réduire le nombre d'animaux à utiliser et obtenir des résultats statistiquement exploitables. Des points limites sont identifiés afin de minimiser l'inconfort, la souffrance ou la détresse potentiels des animaux et de mettre en place la conduite à tenir.

8201 Les dispositifs médicaux hormonaux représentent un outil d'aide à la reproduction bovine et de ce fait contribuent à l'amélioration des résultats en élevage bovin. Ces dispositifs sont destinés à une utilisation chez la femelle, en libérant pendant plusieurs jours consécutifs (environ 7 jours en moyenne) des substances hormonales liées à la reproduction, telles que la progestérone. En fin de traitement, l'arrêt de cette libération hormonale entraîne une chute du taux d'hormone et l'apparition de chaleurs qui permettent une mise à la reproduction de la femelle. La mise au point de ces dispositifs nécessite d'optimiser la capacité de relargage du dispositif, notamment en étudiant différentes zones de contact possible avec l'organisme de la femelle et différents types de dispositifs (dispositifs intra-vaginaux, dispositifs cutanés.)

Cette optimisation passe également par l'étude de différents supports et de différentes concentrations hormonales initiales. Dans tous les cas, la connaissance de la cinétique de relargage (dans le sang et dans le lait) et de la tolérance au niveau de la zone de contact du dispositif sont les prérequis au développement complet d'un dispositif.

Les études de tolérance et de pharmacocinétique pour le développement réglementaire de médicaments vétérinaires vont permettre d'étudier et de caractériser le comportement du médicament dans l'organisme de l'espèce de destination. Dans le cas d'un dispositif d'aide à la reproduction, ces études reposent sur l'observation des zones de contact ainsi que sur l'analyse des prélèvements de sang ou de lait. Les procédures expérimentales correspondantes sont réalisées dans l'espèce de destination selon les lignes directrices en vigueur. Ces lignes directrices définissent le nombre minimal d'animaux requis ainsi que le schéma expérimental le plus adapté à la finalité de l'étude.

Aucune euthanasie de l'animal n'est nécessaire à ces observations. La réutilisation des femelles incluses dans les procédures expérimentales de ce projet peut être envisagée en fonction de la durée et de l'espacement des procédures considérées. Les hormones relarguées s'apparentent aux hormones naturellement produites par les femelles : elles n'entraînent pas de toxicité pour l'organisme et sont rapidement éliminées par celui-ci. Les réactions d'intolérance locale qui pourraient être observées au niveau de la zone de contact seront suivies par un vétérinaire et leur réversibilité documentée.

Le nombre total de femelle bovines nécessaire à la réalisation de ce projet est variable en fonction du nombre de répétition des procédures expérimentales de mise au point et de la capacité de réutilisation des femelles, sans toutefois excéder 300 femelles sur 5 ans. Les femelles utilisées sont des femelles bovines non gestantes. Elles sont hébergées dans leur cadre de vie habituel, alternant des passages en stabulation avec des passages en pâtures à l'extérieur.

8202 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, les produits induisant la super-ovulation permettent le développement de plusieurs follicules qui normalement seraient perdus par atresie au cours de chaque cycle. Elle permet ainsi, entre autres, le transfert d'embryons.

La preuve de concept d'efficacité de nouveaux traitements de super-ovulation doit être évaluée dans l'espèce cible.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études d'évaluation de l'activité pharmacologique d'un nouveau produit destiné à induire une super-ovulation chez la vache laitière ou la génisse, la brebis ou l'agnelle, la chèvre ou la chevrette, et la truie dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir suivre l'exposition de l'animal au médicament et objectiver la super-ovulation induite.

Le projet vise à caractériser les schémas thérapeutiques de nouveaux produits. Plusieurs études d'activité pharmacologique pourront être requises pour établir le profil pharmacologique du produit et définir le schéma thérapeutique de super-ovulation efficace.

Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (préliminaire, pilote, etc.), le nombre de voies d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires et lignes directrices correspondantes en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 500 animaux pour chaque espèce considérée à raison de 500 bovins, 500 ovins, 250 porcins, 250 caprins, soit 1500 au total.

Les études réalisées dans le cadre de ce projet seront conduites séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,

- tous les traitements, suivis échographiques de la super-ovulation et prélèvements (sous anesthésie quand requis) seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU, et aucun d'entre eux n'est susceptible d'induire de dommage ni de souffrance chez l'animal,

- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,

- les points limites sont, entre autres, toute altération inattendue du comportement propre à l'espèce ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour le protéger.

Ce projet couvre également

- le recueil de tissus ou organes dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requis pour les activités de bio-analyse

- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, la validation d'équipements et/ou la génération de données historiques

8203 L'objectif de notre étude est de proposer un nouvel outil diagnostique peropératoire destiné à aider les neurochirurgiens à cartographier les zones saines et les zones lésées du cortex afin d'orienter les résections de tumeurs ou de tissus à l'origine des crises épileptiques, tout en évitant les séquelles importantes chez les patients. En vue de cette application lors des chirurgies du cerveau chez le patient humain, nous avons développé un prototype capable de refroidir très localement le cortex cérébral, permettant ainsi une localisation très fine des aires sensorielles ou motrices telles que les aires contrôlant la parole ou les mouvements des jambes, en alternative à la stimulation électrique standard.

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

Dans le respect de la règle des 3R, chaque animal sera son propre témoin afin de réduire le nombre total d'animaux utilisés. Notre projet prévoit le recours à 10 jeunes porcs charcutiers afin d'assurer la validité des résultats scientifiques escomptés. Pour raffiner notre protocole expérimental, tout au long

de leur séjour dans notre établissement, une attention particulière sera portée au bien-être des animaux qui seront hébergés dans des installations adaptées aux besoins de leur espèce et qui bénéficieront d'une surveillance quotidienne afin de nous permettre d'intervenir de manière appropriée dès le moindre signe d'inconfort des animaux. De plus pour éviter toute souffrance lors de notre expérimentation aiguë, les animaux seront anesthésiés et ils bénéficieront aussi d'un traitement antalgique adapté.

8204 Au cours de la formation en biologie et physiologie, les étudiants reçoivent une formation théorique conséquente sur l'organisation, la physiologie et la physiopathologie des différents systèmes biologiques et notamment des mammifères. Cette formation a pour objectif de préparer les étudiants à la recherche scientifique et médicale publique et privé. Cette recherche utilise des approches d'expérimentation animale et la formation des étudiants doit donc contenir des travaux pratiques de physiologie. Notre objectif dans cette formation pratique est d'augmenter les chances de réussite des étudiants à leur arrivés sur le marché du travail, avec comme principal secteur de recrutement le domaine de la recherche publique et privé.

La conservation des travaux pratiques dans notre formation qui dure 3 ans est important car cela permet de maintenir une confrontation directe des étudiants avec l'expérimentation animale et de les conforter dans leur plan de formation ou au contraire de leur laisser la possibilité d'une réorientation afin d'éviter des prises de consciences trop tardive, source d'échec et de souffrance humaine.

Notre formation nécessite la réalisation de travaux pratiques sur des souris ou rats pour 1) compléter les connaissances théoriques acquises pendant les cours magistraux et les travaux dirigés par des études expérimentales *ex vivo*, 2) former à différentes techniques en physiologie animale, et 3) initier à l'expérimentation animale (contention, et anesthésies des animaux, prélèvements d'organes et études de mécanismes biologiques *in vitro* et *in vivo*).

Respect de la règle des 3R

Cependant, bien que la conservation de quelques travaux pratiques utilisant des animaux de réforme nous semble essentiel, l'équipe pédagogique de notre formation est attachée au bien être animale et à la réduction du nombre d'animaux nécessaire à la formation d'un-e scientifique appliquant des procédures expérimentales aux animaux. En effet, depuis plusieurs années, notre équipe enseignante, dans un souci d'éthique cherche à limiter et remplacer l'utilisation des animaux dans ses formations par la mise en place et la programmation de différentes actions :

- Premièrement, une importante réduction d'utilisation des animaux a été obtenu en remplaçant des séances de TP initialement pratiquées sur des animaux par des méthodes alternatives, utilisant par exemple des logiciels de simulation en expérimentation animale.

- Deuxièmement, grâce à des financements spécifiques de notre établissement, nous avons continué notre politique de réduction et de remplacement des animaux en créant des nouveaux support vidéos d'enseignements de travaux pratiques. Par exemple, les travaux pratiques portant sur l'étude des effets de l'administration de substances agissant sur le système nerveux central et sur les activités exploratrices et motrices de la souris (qui nécessitaient en fonction des effectifs des étudiants environ 200 souris par an) est maintenant dispensé en distanciel par l'utilisation de vidéos. Par cette action nous n'utilisons plus d'animaux vivant pour l'enseignement en 1ère et 2ème année de notre formation. L'utilisation des animaux reste limitée au niveau de la 3ème année. Cependant, à l'heure actuelle, l'utilisation de modèles animaux à des fins scientifiques reste incontournable et la formation pratique des étudiants à leur utilisation reste indispensable.

- Troisièmement, pour la 3ème année de notre formation, nous avons réorganisé complètement nos programmes de physiologie pour intégrer des nouveaux enseignements sur la réglementation, l'éthique, les modèles murins, la prise en charge de la douleur, etc. Deux séries de travaux pratiques en parallèle sont mises en place avec une première série qui nécessite pour l'effectuer un niveau minimum prérequis en physiologie et réussir un examen éthique et réglementaire d'entrée. Dans ces travaux pratiques, les étudiants effectueront des mesures de pression artérielle chez le rat, des ECG sur des souris, de la physiologie cardiaque sur cœur travaillant, la mesure de glycémie et des cultures primaires d'apudocytes. Pour les étudiants qui ne souhaitent pas utiliser d'animaux ou qui échouent à l'examen d'entrée une deuxième série d'enseignement est mise en place, utilisant des logiciels de

simulation et des travaux pratiques de physiologie humaine réalisés par les étudiants sur eux-mêmes (mesure des gaz respiratoire, ECG, EEG, ...). Par ces réorganisations de nos programmes nous souhaitons dans un avenir très proche faire une demande d'habilitation à décerner l'habilitation à appliquer les procédures expérimentales aux animaux (ex niveau II) ce qui permettra de coupler cette formation avec nos enseignements de travaux pratiques. Pour obtenir cette habilitation les étudiants devront valider l'examen éthique et réglementaire d'entrée de première série des TP ainsi que tous les modules de physiologie de leur formation et un examen final supplémentaire. Cette possibilité de coupler nos solides et complets enseignements de physiologie avec la formation réglementaire nous permettra de diminuer drastiquement le nombre de souris ou rats nécessaire à la formation professionnelle d'une personne. En effet, chaque étudiant qui obtiendra son diplôme et l'habilitation à appliquer des procédures expérimentales utilisera pendant ses 3 années de formation et sa formation réglementaire 1,33 animal (pour un groupe de 3 étudiants 3 souris de réformes (normalement destinées à l'euthanasie pour tri génétique ou fin de protocole) et 1 rat de réforme quand cela est possible, ce qui correspond sur 5 ans à un nombre total de 600 rongeurs). Evidemment, tous nos animaux sont hébergés en cages ventilées enrichies de tunnels pour se camoufler, ou de papier pour réaliser des nids et toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie avec une prise en charge analgésique adaptée à chaque technique. Les étudiants qui ne souhaitent pas continuer en physiologie ou qui n'ont pas le niveau minimum prérequis en physiologie et/ou qui échouent à l'examen éthique et réglementaire n'euthanasieront plus d'animaux pour leur formation. Par ce nouveau programme de physiologie nous voulons aussi améliorer la formation et la sélection des futures professionnels de l'expérimentation animale dans la recherche publique et privée en sélectionnant à l'avenir que des candidats avec une formation extrêmement complète en physiologie mais aussi et surtout en éthique et réglementation de l'expérimentation animale.

8205 Pour parfaire le geste chirurgical lors de la résection des tumeurs cancéreuses, il est nécessaire d'améliorer la détection des lésions invisibles à l'œil nu. Cette problématique est particulièrement aiguë dans le cas des carcinomatoses intra-péritonéaux, constituées de petites métastases provenant des cancers de la cavité abdominale (cancers ovariens, colorectaux), qui sont difficilement détectées par l'œil du chirurgien.

Les techniques d'imageries cliniques telles que le scanner ou la Tomographie à Emission de Positron (TEP) ne permettent pas de détecter les nodules péritonéaux de moins de 7 mm. De plus, ces techniques ne peuvent pas être utilisées pendant la chirurgie. Seule une exploration de la cavité péritonéale (laparoscopie) peut confirmer le diagnostic, estimer la progression de la maladie, et permet de réaliser des biopsies. Cependant, les lésions microscopiques ne peuvent être repérées et sont donc ignorées. Une détection améliorée est d'un intérêt majeur pour la résection complète des tumeurs et des petits nodules qui ne sont pas totalement discernables à l'œil.

Dans ce contexte l'imagerie optique de fluorescence est une technologie émergente et prometteuse grâce à l'utilisation de nanoparticules qui possèdent des potentialités remarquables pour marquer les tissus cancéreux et ainsi établir une cartographie des tumeurs et guider leur résection. Cependant, la toxicité des nanoparticules est un frein à leur utilisation en clinique. C'est pourquoi, le but de ce projet est l'évaluation du devenir dans l'organisme (bio-distribution) et de l'excrétion par voie rénale (urine) ou hépatobiliaire (fèces) de nanoparticules de silice, sphériques d'environ 150 nm de diamètre, à base d'indium dont la persistance dans l'organisme constituerait un inconvénient majeur pour l'application clinique.

- Avantages : l'indium fait partie des métaux lourds potentiellement toxiques cependant la quantité d'indium utilisé dans l'étude n'est pas susceptible de provoquer une cytotoxicité aiguë.

- Inconvénients : L'injection intrapéritonéale (i.p.) ou intraveineuse (i.v.) des nanoparticules est un geste invasif. Le placement de la souris pendant 4 jours dans une cage à métabolisme pour recueillir les fèces et l'urine provoque un stress chez l'animal du fait de l'isolement de l'animal habitué à vivre en société et de l'absence de litière (pas de possibilité d'enfouissement)

- Nombre et types d'animaux : 168 souris. Il est justifié par le nombre de types de nanoparticules susceptibles d'être testées (3 types) ainsi que par la stratégie d'expérimentation et l'approche statistique. Pour l'excrétion, les groupes expérimentaux comprennent 4 souris pour chaque type d'injection (i.p. et i.v.) soit 8 souris par type de nanoparticules (24 souris en tout). Pour la bio-

distribution 1h, 4h, 8h, 72h, 7j et 3 mois après injection, 4 souris par type d'injection seront analysées pour chacun de ces temps soit 48 souris par type de nanoparticules (144 souris en tout).

- Conformément aux exigences de réduction, le nombre de souris est calculé au plus juste du fait de la démarche statistique appliquée. En effet, il s'agit de démontrer que le pourcentage d'indium excrété est supérieur à 14% de la dose injectée. Pour la bio-distribution, le nombre de 4 souris par groupe expérimental est suffisant pour établir une moyenne car il n'y a pas d'étude statistique prévue.

- Conformément aux exigences de remplacement, la cytotoxicité des nanoparticules a été testée in vitro sur des cellules en culture et par des tests d'hémolyse (destruction des globules rouges).

- Conformément aux exigences de raffinement, les injections i.p., i.v. et l'euthanasie sont réalisées sur animal anesthésié. Pour l'excrétion, les cages à métabolisme permettent un échange optique, olfactif et acoustique continu avec les congénères. Pour que la souris conserve une possibilité de retrait, une "maisonnette" en plastique lisse et coloré est fixée à la grille de la cage. Le placement en cage métabolique est réduit à 4 jours ce qui suffit pour estimer le niveau d'excrétion. Les points limites concernent la perte de poids (> 20 % du poids initial), la déshydratation sévère (maintien du pli de la peau), tout comportement indiquant la souffrance (absence de toilettage, changement dans la posture et dans la démarche, léthargie ou réticence à se déplacer, vocalisations, état défensif, refus de se faire manipuler ou intolérance aux manipulations, grincements des dents, grattage, morsure) et la survenue d'une blessure (automutilation ou accidentel lors de la manipulation).

8206 La rétinite pigmentaire (RP) est une maladie héréditaire caractérisée par une dégénérescence des photorécepteurs. Chez l'homme la cécité est due à une perte du segment externe du photorécepteur à cône, la partie photoréceptrice de la cellule, tandis que les corps cellulaires des cônes ainsi que les cellules bipolaires et ganglionnaires peuvent rester en vie longtemps après la perte de la vision. Il a été récemment démontré que ces cônes au repos peuvent être réactivés par la lumière, avec un vecteur viral AAV (Adénovirus Associated Virus) exprimant l'halorhodopsine, pompe à chlorure sensible à la lumière et d'origine bactérienne. Après injection sous-rétinienne du vecteur AAV-Halorhodopsine, chez un rongeur, modèle présentant une dégénérescence des photorécepteurs, nous avons mis en évidence une réponse des cellules ganglionnaires de la rétine ainsi qu'une acuité visuelle améliorée. Tous ces résultats suggèrent qu'il est possible de restaurer une fonction normale de la rétine, en infectant les cellules rétinienne par des opsines bactériennes.

Le projet présenté vise à restaurer l'activité des cônes mais aussi des neurones de 2ème et 3ème ordre, en vue d'une application thérapeutique chez l'homme.

Il ne peut être réalisé que dans un modèle de primate non humain présentant une organisation de l'œil semblable à celle de l'homme, contrairement à celui du rongeur.

Il mettra en œuvre au total un maximum de 170 primates non humain de sexe indifférent, répartis en 35 séries suivant un plan expérimental au cours duquel seront évaluées l'innocuité des voies d'administration, l'efficacité de différentes suspensions virales et surtout la capacité de différentes opsines bactériennes à réactiver les cellules ciblées. Les procédures sont construites de manière à optimiser le nombre d'animaux dans chaque série, en utilisant à chaque fois le controlatéral d'un œil comme témoin expérimental ou comme receveur d'un autre type de vecteur. L'effectif est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ces animaux sont nés et élevés dans des élevages reconnus.

Toutes les interventions se feront sous anesthésie générale pour réduire la contrainte imposée aux animaux. Ce projet s'appuie sur des études préalables in vitro et in vivo chez des modèles rongeurs. La mise en œuvre d'un suivi longitudinal non invasif par imagerie in vivo permet de diminuer le nombre d'animaux. Les méthodes expérimentales ont été choisies pour éviter toute souffrance lors des interventions et des critères de points limites sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement s'il y a signe de souffrance et de veiller au bien-être des animaux. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de décider d'une euthanasie.

8207 Notre processus de production assure le développement d'anticorps monoclonaux (AcM) pour le compte de différentes équipes de recherche publiques ou privées.

Les anticorps sont produits par le système immunitaire d'un animal comme moyen de défense contre un immunogène spécifique. Les immunogènes (antigènes) sont des molécules qui peuvent déclencher une réponse immunitaire spécifique; il s'agit généralement de substances étrangères comme des protéines ou des glucides, ou parfois des lipides et des acides nucléiques. Le système immunitaire des mammifères comporte un grand nombre de lymphocytes ayant leur spécificité propre, c'est-à-dire portant des récepteurs capables de reconnaître un seul antigène. La diversité des récepteurs permet des réponses immunitaires contre un large éventail d'immunogènes. Chaque molécule d'anticorps peut reconnaître un épitope (déterminant antigénique), qui est habituellement composé de cinq ou six acides aminés ou unités de monosaccharides assemblés linéairement ou formant une certaine structure. A la différence des anticorps polyclonaux qui sont constitués d'un mélange d'anticorps provenant de plusieurs lymphocytes différents, un AcM est un anticorps qui a été fabriqué par un seul et même lymphocyte, cloné en plusieurs milliers de cellules identiques.

Les AcM sont devenus des outils de choix en recherche fondamentale, en diagnostic et en thérapeutique. Les AcM ont de nombreuses utilisations en recherche telles que la détection de molécules dans les essais du type ELISA, les révélations de Western-Blot, les procédures immunohistochimiques et d'immunoprécipitation, en immunofluoromicroscopie et en immunoelectromicroscopie. Les AcM rentrent également dans les kits de diagnostic de grossesse et de pathologies oncologiques et infectieuses.

D'un point de vue thérapeutique, le développement d'AcM dirigés spécifiquement contre des marqueurs de cellules cancéreuses a mené à la génération de différents médicaments, tel que l'Herceptin® (cancer du sein), ou l'Avastin® (cancer du côlon). Les AcM sont considérés comme une voie d'avenir précieuse notamment pour des pathologies qui n'ont pas de traitement ou des traitements peu satisfaisants (ex : rejet de greffe rein, foie et cœur).

Ce programme se base sur une approche d'immunisation génique, décrite pour la première fois en 1996, consistant à induire l'expression d'une protéine du non soi afin d'initier une réponse immunitaire spécifique de cet antigène. La technique d'immunisation consiste à injecter très rapidement un grand volume de sérum physiologique contenant une grande quantité d'acides nucléiques par voie intraveineuse au niveau de la veine caudale. Cette injection va permettre une expression du transgène non négligeable dans divers organes dont le foie. La protéine cible ainsi exprimée va déclencher rapidement une réaction immunitaire. Il s'agit d'une technique bien référencée dans la littérature.

L'immunisation génique présente des avantages par rapport à des protocoles d'immunisation classiques. Elle ne nécessite pas l'ajout d'adjuvant. Contrairement à des immunisations peptidique ou protéique, la synthèse in vivo de la protéine codée par le plasmide permet l'expression de l'antigène dans sa conformation native et correctement glycosylée. Cette caractéristique favorise la production d'anticorps neutralisants efficaces par les lymphocytes B.

Des échantillons de sang de l'animal immunisé seront prélevés pour évaluer la réponse immunitaire.

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'AcM 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 50 souris sera nécessaire, afin de maximiser les chances d'obtention d'hybridomes sécrétant des anticorps présentant les spécifications attendues.

Les efforts se sont focalisés pour appliquer, autant que faire se peut, la règle des 3R à savoir, Remplacer (choix de l'espèce qui sera utilisée pour la production d'anticorps), Réduire (optimisation du nombre d'animaux à engager dans le protocole), Raffiner (améliorer les protocoles pour éviter toute souffrance inutile : absence d'adjuvant).

La souris reste l'animal le plus utilisé pour l'obtention d'AcM, car les souris sont des animaux de petite taille et sont faciles à élever. L'utilisation de souris permet d'utiliser à la fois des cellules de myélome et des lymphocytes B compatibles entre eux pour l'étape de fusion.

En se basant sur le nombre moyen d'animaux par protocole, nous faisons une demande pour 50 souris (2 x 25).

Le temps minimum d'immunisation est de 85 jours.

Dans la production d'AcM, la principale priorité est de réduire autant que possible la douleur et la détresse chez les animaux utilisés. L'animal ne sera mis en protocole qu'après avoir subi une période de quarantaine et qu'il ait satisfait à cette période.

Le protocole d'immunisation est de degré de gravité légère car il n'y a pas d'adjuvant utilisé. Une injection hydrodynamique au niveau de la veine caudale sera réalisée conformément aux bonnes pratiques vétérinaires.

Les animaux sont surveillés tous les jours (y compris le week-end) 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 socialisation.

8208 Les ovins et caprins sont régulièrement utilisés dans la recherche préclinique dans le domaine de la santé animale (espèce cible) et dans le domaine de santé humaine (pour les ovins). Ils sont notamment inclus dans des études de tolérance (locale ou générale) qui ont pour but de mettre en évidence des réactions locales au site d'application (tolérance locale) ou l'éventuelle toxicité du médicament vétérinaire dans les conditions normales d'emploi chez l'animal (tolérance générale sur espèce cible) ou d'un médicament humain (tolérance générale sur modèle animal).

Dans ce type d'étude, un suivi des modifications hématologiques, biochimiques et/ou enzymatiques (sang/urine), des potentielles modifications macroscopiques et microscopiques des tissus et organes et/ou suivi du produit dans l'organisme entier (détection dans le sang/plasma, détection dans les urines, détection dans les tissus) est également possible.

Aucune méthode alternative ne permettant actuellement d'évaluer la tolérance de l'organisme suite à administration d'un produit, il est indispensable de recourir à l'animal entier.

Ce projet se déroulera sur plusieurs études et selon plusieurs procédures expérimentales :

- la procédure d'administration du produit à tester,

- la procédure de prélèvements sanguins répétés.

- de plus des prélèvements de différents tissus ou organes seront parfois nécessaires.

Les prélèvements de sang seront toujours réduits au minimum et toujours conformes aux bonnes pratiques vétérinaires.

Durant toute la phase expérimentale, les animaux seront hébergés majoritairement par groupe ou de façon individuelle que si nécessaire.

Le nombre d'animaux utilisé sera le nombre d'animaux minimum décrit dans les lignes directrices sauf dans le cas de produits connus pour entraîner de la variabilité des résultats attendus (dans ce cas le nombre d'animaux sera calculé en fonction des données existantes)

L'hébergement des animaux est conforme à la directive en vigueur et conforme au programme d'enrichissement du milieu.

Un suivi quotidien (voir plusieurs fois par jour) sera mis en place pour l'observation générale des animaux et la détection précoce d'éventuels effets secondaires pour une prise en charge rapide (observation de l'état de santé général, consommation alimentaire et hydrique.).

Au total, au maximum 120 animaux pourront être utilisés en 5 ans.

8209 Plusieurs méthodes permettent de visualiser les structures internes de l'œil. Toutes les techniques d'imagerie par injection intra-vitréenne comportent avantages et inconvénients. La tomographie en cohérence optique et l'ophtalmoscopie laser à balayage confocal sont les plus répandues. Ces deux techniques nécessitent une transparence optique élevée de l'échantillon et peuvent être utilisées dans l'étude des structures du segment antérieur de l'œil ou du fond de l'œil. Une seule technique ne permet pas de visualiser de façon simultanée et en haute résolution toutes les parties fonctionnelles de l'œil. A l'aide de techniques d'imagerie récemment mises au point, nous comptons représenter pour la

première fois toutes les parties internes du globe oculaire, en très haute résolution, en se concentrant sur la rétine. Nous établirons donc un programme permettant de nouvelles études des pathologies oculaires. Ces études utiliseront le modèle d'œil humain le plus connu, celui du lapin. Cette étude ne peut être réalisée post mortem, en raison de la dégradation rapide de l'organe. 40 lapins seront nécessaires pour établir le programme, surmonter les difficultés techniques, notamment l'injection de produits de contraste et la visualisation rapide du système vasculaire rétinien. 40 est le nombre minimum qui permet d'obtenir des résultats statistiques significatifs et d'instaurer des protocoles fiables afin de continuer à développer l'étude. Toutes les procédures seront réalisées sous anesthésie générale et sous analgésie locale, afin d'éviter la moindre souffrance. Les paramètres physiologiques des animaux seront surveillés pour vérifier le niveau d'anesthésie. En cas d'apparition d'effets inattendus sévères, une analgésie supplémentaire lui sera administrée. Le stress des animaux sera réduit au minimum; ils auront accès à de la nourriture/de l'eau à volonté et les cages seront équipées de jouets adaptés à l'espèce.

8210 Le cancer du sein est la 2ème cause de cancer en général et la première cause de cancer chez la femme. Parmi les femmes atteintes du cancer au sein et initialement sans métastase, 20% récidiveront avec métastases dans les 5 ans Les métastases sont traitées par chimiothérapie ou thérapie ciblée, en fonction des résultats histologiques obtenus au niveau de la tumeur primaire. Cependant les cellules constituant les métastases peuvent être différentes de celles de la tumeur primaire. Il serait donc primordial de pouvoir caractériser, à priori, les différentes métastases, c'est-à-dire de les phénotyper pour effectuer ensuite une thérapie ciblée. Dans ce cadre, l'objectif de la médecine nucléaire est donc de développer les meilleurs radiomarqueurs pour la diagnostique et la radiothérapie interne vectorisée (RIV) des métastases du cancer du sein et une des cibles proposée pour ce projet est l'intégrine $\alpha V\beta 3$. L'intégrine $\alpha V\beta 3$ joue un rôle prépondérant dans l'angiogénèse, la prolifération et la dissémination des métastases tumorales. Elle est surexprimée par les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux et des cellules de nombreux cancers, entre autre le cancer du sein.

Nous disposons de deux molécules ciblant cette intégrine $\alpha V\beta 3$. L'objectif est de déterminer quelle est celle qui possède les propriétés plus intéressantes pour une approche diagnostique : dans ce cas la molécule est marquée au Gallium-68, un émetteur de rayon gamma adapté à l'imagerie). En parallèle, et en prospective d'une application thérapeutique, nous effectuerons une étude de stabilité in vivo des deux molécules marquées au Lutétium-177, ce radioélément étant utilisé pour les applications thérapeutiques. Nous effectuerons une étude de bio-distribution de ces deux molécules marquées au Gallium-68 sur des rats Wistar (10 rats nécessaires) afin d'observer la captation de chaque molécule dans les différents tissus.

Pour l'étude de stabilité in vivo les molécules seront marquées au Lutetium-177, injectées chez la souris CD1 et les animaux euthanasiés à un certain temps afin de prélever leur sang pour réaliser les études de stabilité. Pour cela, 24 souris seront nécessaires.

Tout sera mis en œuvre lors de cette étude pour respecter la règle des 3R (Remplacer, Réduire et Raffiner) : Les molécules à évaluer ont été au préalable validées par des tests in vitro, et cette étude constitue un passage obligatoire chez l'animal en vue du transfert en clinique. Le nombre minimum d'animaux permettant d'obtenir des données statistiquement fiables sera utilisé. Enfin les animaux seront hébergés en groupe avec enrichissement du milieu de vie, et un suivi quotidien de leur bien-être sera réalisé.

8211 Plus de 140 millions de personnes se sont sédentarisés dans les régions de haute altitude (Asie, Afrique et Amérique du Sud) où les conditions sont un défi pour la survie. Cependant, beaucoup de personnes vivant en haute altitude, en particulier dans les Andes, semblent inadaptées et souffrent de ce que l'on appelle le mal chronique des montagnes, également appelée maladie de Monge. Cette pathologie se rencontre essentiellement au sein de populations vivant en haute altitude. Dans les Andes, la prévalence est estimée à environ 10% de la population adulte vivant au-dessus de 2500m. Les symptômes sont nombreux et handicapants. Parmi ceux là des céphalées, des nausées des vomissements, de l'insomnie, une fatigue générale, des vertiges, une dyspnée, des douleurs musculaires et articulaires, des problèmes de mémoires et de l'inappétence peuvent être observée. La maladie de Monge est caractérisée par un nombre excessif de globules rouges (érythrocytose

excessive) associé à une forte concentration en hémoglobine. Le diagnostic repose sur l'association d'une cyanose, d'une pression artérielle d'oxygène (PaO₂) abaissée et un taux d'hémoglobine supérieure à 190g/L chez la femme et 210g/L chez l'homme. Le pronostic est parfois compliqué par une hypertension artérielle pulmonaire, des accidents vasculaires cérébraux et une insuffisance cardiaque. A l'heure actuelle, la saignée est une thérapie d'usage courant mais avec l'inconvénient que l'érythropoïèse excessive réapparaît de manière plus prononcée après 2 à 3 mois. Une autre possibilité thérapeutique consiste en l'administration d'acetazolamide pendant 6 mois. Bien que cette molécule améliore les symptômes et réduise l'hématocrite, de nombreux effets secondaires peuvent apparaître. Ainsi la recherche de stratégies non-pharmacologiques est nécessaire. L'objectif de ce travail est donc d'évaluer sur un modèle animal (le rat) les effets de l'exercice physique sur les mécanismes physiopathologiques de l'érythropoïèse excessive et de l'hypertension artérielle pulmonaire. Pour répondre à cette question, nous analyserons les effets de l'exercice physique sur des rats hébergés soit en condition normoxique soit en condition hypoxique (altitude simulée = 4460m). La complexité et l'invasivité des techniques employées nous obligent à travailler sur un modèle animal (le rat). Cependant, toutes les précautions nécessaires seront prises pour suivre la réglementation des 3R, notamment le nombre d'animaux nécessaires a été estimé à 56 par un test de puissance et le même animal pourra être réutilisé dans plusieurs procédures. Enfin l'hébergement des animaux ce fera selon la réglementation en vigueur, dans des cages disposant de tout l'enrichissement nécessaire. Les animaux seront suivis quotidiennement (poids, état général, prise alimentaire et hydrique). Une perte de poids supérieure à 15% du poids du corps et/ou la perte totale de mobilité (déplacement dans la cage) constitueront les points limites et signifieront la sortie immédiate de l'animal du protocole et l'euthanasie.

Les résultats de cette étude nous permettront certainement d'améliorer la qualité de vie et de diminuer la mortalité des patients souffrant de la maladie de Monge, qui constitue un véritable problème de santé publique pour les pays Andins.

8212 Ce projet vise à comparer les effets des deux agonistes morphiniques les plus utilisés en anesthésie et en réanimation en France ; le rémifentanil et le sufentanil.

Les morphinomimétiques de synthèse possèdent à côté de leur effet analgésique puissant des effets secondaires paradoxaux responsables d'une exacerbation de la douleur postopératoire (hyperalgésie) et d'une tolérance conduisant à augmenter leur dose pour obtenir un soulagement identique. Ces effets s'observent pour des utilisations prolongées (comme chez les patients en réanimation) mais également pour des expositions courtes (comme pour les patients qui subissent une intervention chirurgicale de quelques heures).

Les mécanismes moléculaires qui sous-tendent ces effets sont complexes et font l'objet d'une littérature abondante depuis plusieurs décennies, sans toutefois aboutir à une stratégie simple permettant de limiter ces effets secondaires. Le choix du morphinique à utiliser repose actuellement sur des critères essentiellement pharmacocinétiques. Toutefois, sa capacité à induire plus ou moins d'hyperalgésie postopératoire pourrait être aussi un critère essentiel dans le choix de la molécule. Le rémifentanil et le sufentanil ont des pharmacocinétiques très différentes. Ils induisent tous les deux des phénomènes de tolérance et d'hyperalgésie. Cependant, peu d'études ont comparé leurs effets et les mécanismes sous-jacents après une exposition courte ou prolongée.

Le but de notre étude est de comparer les effets analgésiques mais aussi l'hyperalgésie induite à l'arrêt de ces deux morphiniques chez la souris. Pour cela, nous souhaitons comparer la puissance analgésique par des tests comportementaux sur une plaque portée à 52°C avec une durée maximale inférieure à celle pouvant induire des lésions cutanées même non perçues sous analgésie. Par la suite l'hyperalgésie mécanique induite par le traitement morphinique sera recherchée par la mesure du seuil du réflexe de retrait à l'aide d'un filament de vonFrey électronique. Ces mesures seront faites après une exposition courte (une injection unique) ou prolongée à l'aide d'un diffuseur sous cutané.

Pour l'étude des mécanismes à l'origine de cette hyperalgésie, le groupe avec exposition prolongée, sera euthanasié après 24h de traitement pour des études moléculaires sur la zone du tronc cérébral responsable du contrôle de la douleur (la substance grise périaqueducule), en particulier l'implication de certains récepteurs dans l'hyperalgésie. Des bloqueurs de ces récepteurs sont disponibles et peuvent constituer une piste thérapeutique préventive ou curative.

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

Afin de réaliser l'optimiser au maximum les résultats, des mesures de courbe réponse et tests comportementaux seront faits sur 29 types de mesures. Le nombre de souris nécessaire à chaque mesure est déterminé par les études antérieures qui ont validé ces modèles animaux et montré qu'il fallait moyenner 10 mesures pour s'affranchir des variabilités interindividuelles. Nous estimons nécessaires 290 souris pour la réalisation de ce projet.

Le remplacement des animaux n'est pas possible dans le cadre d'une étude sur la douleur car il n'est pas possible de reproduire celle-ci ex vivo.

Le choix de ce modèle sur la souris est justifié par le fait que les tests comportementaux sur cette espèce ont déjà été validés et les techniques de marquage des récepteurs bien décrites. Ceci nous évite de recourir à des expériences de mise au point de tests expérimentaux sur de nouvelles espèces. De plus, la comparaison de deux analgésiques puissants limite la souffrance animale.

La stabulation d'une semaine permet à l'animal de se familiariser avec son nouvel environnement pour réduire son stress. Les animaux sont en groupes de 5 par cage laissant de l'espace à chacun, limitant les comportements d'agressivité mais permettant des échanges sociaux. L'abondance de la nourriture et de la boisson et le respect des cycles jour nuit y contribuent également. Toutes les expérimentations se feront lors d'un cycle d'éveil. Les manipulations se feront en douceur et au contact d'une surface plane, habituellement la propre cage de l'animal. De plus, les produits utilisés étant des analgésiques puissants, ils réduiront d'autant la douleur lors des mesures initiales et le cut-off de 3 minutes maximum empêche toute lésion de brûlure.

Le bien-être des animaux sera suivi bi-quotidiennement par du personnel formé 5j/7 et quotidiennement pendant les WE et jours fériés. Les principes éthiques et les standards de raffinement sont utilisés tout au long de la vie de l'animal.

8213 Le but de ce projet est de générer une lignée transgénique dédiée à l'imagerie en temps réel du processus de réparation dans des modèles de sclérose en plaques (SEP), pathologie inflammatoire démyélinisante du système nerveux central affectant près de 100 000 personnes en France.

Cette lignée nous est nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la remyélinisation, afin de développer des stratégies thérapeutiques visant à la promouvoir et à limiter la perte neuronale dans la SEP, la phase chronique de la maladie étant sans traitement à ce jour.

Nous utiliserons sur 2 ans un total de 100 souris maximum pour la durée du projet. La règle des 3R a été considérée pour la mise en place du projet et sera appliquée sur le terrain : 1) réduction, le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum pour nous permettre de créer notre lignée transgénique ; 2) raffinement, les procédures prennent en compte le bien-être des animaux. Tous les animaux sont hébergés en portoirs ventilés par cage de 5 individus et les milieux sont enrichis avec des nids de coton. La température et l'hygrométrie sont contrôlées. Tout est par ailleurs mis en œuvre pour réduire au minimum la douleur infligée et la traiter le cas échéant, en interaction avec le vétérinaire de l'animalerie; 3) remplacement, la création d'une lignée transgénique murine est une technique de pointe nécessaire à la validation in vivo de résultats préalablement établis in vitro et ex vivo dans le souci de limiter l'utilisation d'animaux.^[1]_[SEP]

Cette lignée transgénique est de plus non dommageable car la protéine exprimée ne devrait pas induire de toxicité ou d'altération de fonction dans les neurones.

8214 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie musculaire héréditaire et fatale la plus fréquente chez l'enfant, est causée par des mutations dans le gène codant pour la dystrophine.

La recherche sur le rôle de la dystrophine pendant la régénération musculaire est entravée par le manque d'un modèle animal permettant l'imagerie in vivo de la dystrophine. Pour cela, nous avons créé une lignée murine rapportrice DmdEGFP qui exprime de manière endogène la protéine dystrophine fusionnée à la protéine fluorescente EGFP et permettant ainsi la visualisation de l'expression de la dystrophine par fluorescence.

Dans le projet proposé ici, nous utiliserons cette nouvelle lignée murine pour étudier le rôle de la dystrophine pendant la régénération musculaire in vivo dans le but d'avoir une meilleure compréhension de la fonction des cellules souches musculaires in vivo et de la dynamique de la dystrophine suite à une lésion musculaire aiguë (remplacement).

De plus, nous avons croisé la lignée murine DmdEGFP dans le fond génétique mdx (modèle murin de la pathologie DMD, ayant une mutation sur l'exon 23 du gène de la dystrophine) et nous avons généré le premier modèle murin dystrophique rapporteur que nous dénommons DmdEGFP-mdx. Nous allons utiliser cette lignée DmdEGFP-mdx pour étudier in vivo l'efficacité d'une des approches thérapeutiques actuelles les plus prometteuses pour DMD, l'utilisation d'oligonucléotides antisens tricyclo-DNA pour le saut de l'exon 23 du gène de la dystrophine.

Ainsi, nous utiliserons deux lignées murines et nous estimons un total de 615 souris pour le 5 ans. Ce nombre est en accord avec les principes de réduction. Toutes les souris sont surveillées quotidiennement afin de détecter tout signe de douleur, souffrance et angoisse. Si nécessaire nous évaluerons nos animaux selon une grille de suivi (raffinement). Les études menées sur ces animaux n'ont pas fait l'objet d'études antérieures dans d'autres pays.

8215 Le cancer du col de l'utérus est la deuxième cause mondiale de mortalité chez la Femme due à un cancer. Dans la majorité des cas, une infection persistante causée par un virus du Papillome Humain (VPH) est incriminée. En France, la vaccination préventive de l'adolescente, est une approche prophylactique récente qui permet d'éviter une première infection par les VPH à haut risque. Pour les femmes déjà infectées, des interventions chirurgicales sont pratiquées pour extraire les lésions cancéreuses. Un vaccin thérapeutique efficace pour ces femmes déjà infectées par un VPH de ce type constituerait une alternative qui permettrait à la fois de les soigner de manière non invasive mais également de minimiser les risques de rechute.

Notre laboratoire souhaite évaluer chez le chien, un candidat vaccin thérapeutique contre le cancer du col de l'utérus à visée humaine, en termes d'efficacité. Des études chez le chien en interne qui ont déjà fait l'objet d'autorisation éthique, nous ont permis d'avoir des données préliminaires d'immunogénicité ainsi que d'innocuité mais ne donnent pas la preuve de l'efficacité thérapeutique de ce vaccin. Afin d'évaluer l'efficacité vaccinale et au lieu d'utiliser un modèle classique utilisant des animaux malades, nous allons mettre au point une méthode in vivo alternative minimalement invasive : une technologie de transfert de gène appelée lentigénèse. L'étude qui fait l'objet de la présente demande d'autorisation éthique, vise à tester l'efficacité en premier lieu chez la souris, avant de passer chez le chien, afin de diminuer notamment le nombre de chiens ensuite.

Dans cette première phase, nous allons valider la preuve de concept de l'efficacité du candidat vaccin chez la souris. Cette étude nous permettra d'obtenir un protocole de lentigénèse fiable et une cinétique de suivi validée. Pour limiter le nombre d'animaux testés, nous allons utiliser le nombre minimum d'animaux par groupe permettant de réaliser des études statistiques comparatives. Nous aurons besoin de 42 souris au maximum pour cette étude. Hors procédures, les souris sont observées quotidiennement par un zootechnicien ou un scientifique, et l'enrichissement est réalisé au moyen de papier absorbant pour l'établissement d'un nid. Au cours des procédures, les souris seront soit sous anesthésie gazeuse soit sous anesthésie fixe, avec antalgique et lumière infra-rouge pour le réveil.

Les résultats obtenus nous permettront ensuite de tester chez le chien cette procédure minimalement invasive, avec un protocole de suivi et d'analyse déjà validé.

8216 Les sujets (humains et animaux) aveugles précoces compensent leur handicap en développant une perception auditive supranormale. Ils sont meilleurs que les sujets voyants pour discriminer et localiser les sons dans l'espace. Mais les bases neurales précises régissant un tel processus de compensation qui s'opère via l'audition restent très mal connues, en particulier au niveau cortical. Ce qui advient à ce niveau en fonction du gène affecté et de la pathologie oculaire associée l'est encore moins. Notre objectif ici est précisément d'étudier la relation « Gène – Cécité – Plasticité Corticale ».

Le cortex visuel est déjà connu pour participer à la mise en place de ce processus. Nous proposons ici de comparer les réorganisations fonctionnelles survenant simultanément au niveau de toutes les aires visuelles corticales chez des Souris aveugles précoces de différents types. Les unes seront

aveugles dès la naissance (modèle de la maladie génétique de l'Amaurose de Leber). Les autres seront aveugles pendant l'enfance (modèle de la maladie de Rétinite pigmentaire). Nous espérons observer des processus de compensation différents selon les modèles.

Pour cela, nous enregistrerons les réponses auditives qui se mettront en place au niveau de toutes les aires visuelles corticales in vivo : chez des animaux avec une expérience visuelle normale, seules des réponses neuronales à une stimulation visuelle sont enregistrées dans ces aires. Chez des animaux aveugles, des réponses à des stimulations auditives sont susceptibles d'y être enregistrées. Ces expériences ne peuvent pas être réalisées sur des cultures de cellules. Il n'est pas non plus possible de remplacer ce type de protocoles par des modèles in silico. Sur les 3 années du projet, nous utiliserons au maximum un total de 84 souris (entre 63 et 84). Ce nombre a été évalué par des tests statistiques de façon à limiter le nombre d'animaux. De plus, nous veillerons au bien-être des animaux par l'utilisation d'analgésie et d'anesthésie lors des procédures opératoires, et par un enrichissement de leur environnement dans les cages d'hébergement.

L'audition devrait compenser la perte précoce de vision à des degrés divers dans les différents groupes « aveugles ». A terme, ces données seront fondamentales pour décider des meilleures stratégies à appliquer pour aider au mieux les aveugles face à leur handicap (thérapie génique ou implant rétinien ou autres).

8217 Notre projet de recherche se focalise sur des stratégies thérapeutiques innovantes applicables à des pathologies d'origine génétique pour lesquelles il n'existe aucun traitement. Nous nous intéressons plus particulièrement aux maladies neuromusculaires et neurodégénératives, dont l'amyotrophie spinale (SMA).

Nos stratégies se basent à la fois sur des approches de thérapie génique, c'est-à-dire le transfert de gènes thérapeutiques au sein de tissus altérés, et sur des stratégies antisens, utilisant des molécules oligonucléotidiques capables d'interférer avec la machinerie génétique des cellules pour rétablir l'expression de la protéine à l'origine défectueuse. Nos approches permettent ainsi de réaliser une véritable « chirurgie du gène ». Plusieurs types de vecteurs de gènes (viraux et non viraux) sont évalués pour les approches de thérapie génique. De la même façon, plusieurs types d'oligonucléotide sont testés dans le cadre des stratégies antisens.

L'ensemble de ces outils moléculaires est tout d'abord évalué in vitro (remplacement) afin de sélectionner les candidats les plus prometteurs et de remplacer autant que possible l'évaluation in vivo (réduction). Le développement préclinique des molécules les plus prometteuses requiert cependant une évaluation thérapeutique in vivo sur des modèles murins appropriés et nous utilisons pour cela un modèle murin de la SMA ainsi qu'une souche de souris contrôle. Ce projet de recherche d'une durée de 5 ans requiert l'utilisation de 600 souris par an au maximum, soit 3000 souris pour le projet. Les modèles murins utilisés dans ce projet présentent des phénotypes peu dommageables et les procédures employées ont toutes pour objectif de corriger le phénotype pathologique des animaux. Toutes les souris seront surveillées quotidiennement afin de détecter tout signe de douleur, souffrance et angoisse (raffinement). Ce projet de recherche translationnelle vise à développer des candidats cliniques pour le traitement de la SMA et leur évaluation préclinique sur des modèles murins est donc indispensable mais sera bien évidemment restreinte aux candidats les plus prometteurs issus d'une sélection in vitro.

8218 A l'heure actuelle, la reconstruction des pertes de substance osseuse demeure toujours un défi technique, matériel et économique. Leur incidence ne cesse d'augmenter compte tenu du vieillissement général de la population. Sans remettre en cause leur efficacité incontestable, l'utilisation des autogreffes (gold standard) présente des inconvénients majeurs (volume disponible, morbidité du second site opératoire notamment). L'allogreffe osseuse a également été proposée mais expose au risque de rejet immunitaire et/ou de transmission de pathologies infectieuses.

Les progrès en science des matériaux combinés aux progrès de l'ingénierie tissulaire contribuent au développement de substituts osseux biologiques, principalement à base de phosphate de calcium ou encore de polymères, capables de restaurer et de maintenir les fonctions du tissu osseux.

La sélection d'un matériau idéal de greffe osseuse repose sur diverses propriétés : la capacité de cicatrisation osseuse, de néo-vascularisation, les caractéristiques biomécaniques, etc. Après la phase d'étude in vitro, il est indispensable de tester nos biomatériaux en conditions in vivo, sur modèle animal. Cependant, les études précliniques effectuées sur chaque matière sont limitées par le manque de modèle animal pertinent, ce qui réduit leur applicabilité clinique.

Cette étude va dans premier temps développer et valider un modèle animal de régénération osseuse, en créant des pertes de substance osseuses crâniennes et mandibulaires (aux contraintes mécaniques différentes), bilatérales, qui seront d'un côté laissées en cicatrisation dirigée (côté « contrôle ») et de l'autre côté greffées (par os autologue ou biomatériau) (côté « étude »). Les animaux seront euthanasiés à 4 et 12 semaines, et les sites mandibulaires et crâniens seront prélevés pour analyse biomécanique, microscannographique et histologique.

Une fois ce modèle validé, le biomatériau développé par nos partenaires européens, ou d'autres matériaux développés par nos soins seront testés sur ce modèle, et ce, afin de développer des matériaux de substitution osseuse mieux tolérés et plus efficaces.

Tous les efforts ont été faits pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés et pour affiner les expériences de manière à leur causer le moins de douleurs et de détresse possible.

Remplacement :

Bien que les résultats obtenus par les tests in vitro soient très prometteurs, la réalisation de test in vivo est indispensable pour évaluer les différents éléments suscités. Ils nous ont permis de sélectionner le meilleur biomatériau pour l'étude animal, réduisant ainsi au maximum l'utilisation des animaux ;

Raffinement :

1. Toutes les procédures seront effectuées sur des lapins anesthésiés ayant reçu une analgésie préopératoire, ne provoquant ainsi aucune douleur. Tout au long de la procédure chirurgicale, les souris seront sous isoflurane, sur plaque chauffante. Les animaux recevront en postopératoire un traitement analgésique (buprénorphine durant 72 heures, i.m.) et un régime normal ad libitum.

2. Pour permettre un bon accès à la mandibule, la méthode v-gel® intubation (supraglottic airway devices) est choisie pour une anesthésie générale sans nécessiter d'utilisation d'intubation endotrachéale, ce qui est à l'origine de nombreuses problèmes de morbidité et de mortalité liés aux voies respiratoires.

3. Au cours de l'étude, les animaux seront observés et surveillés de près chaque jour à l'égard de leur bien-être et de leurs conditions optimales de cicatrisation et de récupération. En cas d'inévitable nécessité, la décision d'euthanasie de l'animal sera prise et réalisée avant que les animaux ne souffrent.

Réduction :

Un minimum de 10 animaux par groupe sera nécessaire et suffisant pour montrer avec une puissance statistique suffisante ($\alpha=80\%$, $p=0.05$). En total, 80 lapins seront utilisés dans ce projet. Les études précédentes ont été réalisées pour démontrer les procédures et conditions expérimentales permettant d'atteindre les objectifs scientifiques.

8219 Le cancer est une maladie caractérisée par la prolifération incontrôlée de cellules, liée à un échappement aux mécanismes de régulation qui assurent le développement harmonieux de notre organisme. Environ 40% de la population se verra diagnostiquer un cancer avant 85 ans. Si de nombreux cancers aujourd'hui peuvent être traités, certains gardent un mauvais pronostic. Actuellement, de nombreux traitements proposés aux patients ont pour objectif de renforcer la réponse immunitaire anti-tumorale. Néanmoins, les cellules effectrices, les différents sites d'action de l'immunothérapie restent encore à être identifiés.

L'objectif de ce projet est de mieux comprendre grâce à l'utilisation de l'imagerie sur animaux entiers, les phases précoces de la croissance tumorale, la réponse immunitaire et le mode d'action des traitements ainsi que leurs effets locaux et systémiques sur la réponse immunitaire. Pour cela nous tenterons d'identifier le rôle de chacun des types cellulaires retrouvés au sein d'une tumeur tels les

neutrophiles, les macrophages et les lymphocytes T. Nous tenterons d'évaluer leur champ d'action par effet direct ou indirect puis d'étudier les effets des différents traitements actuellement en essai clinique sur la réponse immunitaire et la croissance de la tumeur.

Nous nous intéresserons particulièrement au lymphome et au mélanome contre lesquels un grand espoir de thérapie est basé sur de nouveaux traitements qui renforcent le système immunitaire.

Afin de respecter la règle des 3R, de nombreuses expériences seront validées au préalable in vitro pour remplacer les animaux. Néanmoins, les animaux nous sont indispensables pour répondre à nos questions car ils permettent de visualiser plusieurs types cellulaires simultanément mais surtout de suivre une cinétique physiologique. Par ailleurs l'animal est indispensable afin d'identifier les sites d'action des immunothérapies. Notre projet précédent nous avait effectivement permis d'identifier le foie comme un site majeur de déplétion de cellule B suite à l'administration de l'anti-CD20. Quand il sera possible, les animaux utilisés pour l'imagerie seront aussi utilisés pour la cytométrie de flux afin de réduire un maximum le nombre d'animaux utilisés. Par ailleurs, l'imagerie sur animal vivant permet de réduire le nombre utilisé et participe aussi à la règle des 3R.

Enfin, notre expertise avec les tumeurs et la grille d'évaluation de la douleur nous ont permis d'établir des points limites qui entraîneront l'euthanasie de la souris dès l'apparition de certains critères définis plus bas. L'anesthésie et l'administration d'analgésiques seront utilisées de façon adéquate afin de réduire au maximum la douleur des animaux. Les animaux qui auraient reçu des cellules tumorales feront l'objet d'un suivi strict notamment par dosage sanguin. De plus, une des procédures permettra d'identifier de nouveaux points limites selon le pourcentage de cellule tumorale circulante (lymphome) dans le sang.

Ce projet comporte 7 procédures : 5 modérés et 2 légères pour un total de 2520 souris males ou femelles.

8220 Les plaquettes sanguines sont essentielles pour le maintien de l'intégrité vasculaire et l'arrêt des saignements. Les thrombopénies auto-immunes résultent de l'émergence d'anticorps antiplaquettaires. La fixation de ces anticorps sur les plaquettes entraîne leur élimination dans la rate ou le foie, et en conséquence, une chute de leur numération sanguine. Une thrombopénie auto-immune sévère peut donc s'accompagner d'hémorragies graves. Le but du projet est de comprendre comment se forment ces auto-anticorps en tirant partie d'une mutation d'une protéine plaquettaire (protéine G6b-b, chez la souris, ou MPIG6B, chez l'homme) qui s'accompagne du développement d'auto-anticorps. Cette déficience permet d'aborder la compréhension du développement des auto-anticorps antiplaquettaires sous un angle jamais abordé jusqu'à présent.

Les animaux seront élevés dans des conditions normales, des prélèvements sanguins périodiques seront réalisés, à la fin de l'expérimentation, les souris seront euthanasiées pour une analyse des tissus. Plusieurs temps devront être analysés pour suivre dans la durée le développement des anticorps, leurs caractéristiques et spécificités.

Dans d'autres expériences, l'impact des anticorps antiplaquettaires sur la durée de vie des plaquettes sera analysé. A cette fin, des plaquettes fluorescentes seront transfusées, puis leur devenir sera suivi pendant 4 jours par prélèvement sanguin journalier.

Remplacement.

Le développement d'une réaction auto-immune met en jeu des mécanismes cellulaires complexes qui se mettent en place sur des durées de plusieurs semaines, voire mois, que seules les expériences avec des animaux permettent de suivre. Néanmoins, en fonction des observations sur les prélèvements, des expériences complémentaires permettant l'analyse des mécanismes cellulaires immunologiques peuvent être conduites en utilisant des populations cellulaires définies obtenues à partir des animaux euthanasiés.

Raffinement : Bien que les souris soient thrombopéniques et présentent un temps de saignement prolongé, en condition d'élevage normal, aucun inconfort ou pathologie ne semble associé à la mutation ; effectivement, les animaux ont déjà été élevés jusqu'à 24 mois sans qu'ait été observé d'anomalie particulière physiopathologique. Toutefois, l'attention sera apportée aux animaux quotidiennement afin de surveiller toute manifestation imprévue d'inconfort. Un point limite de souffrance au-delà duquel le protocole sera arrêté est défini. Tous les protocoles décrivant une

injection ou un prélèvement se font sous anesthésie générale gazeuse. Les protocoles sont administrés par des personnes compétentes et sont adaptés afin de minimiser la gêne pouvant être occasionnée aux animaux. Après les transfusions de plaquettes la cage des animaux est sur-enrichie de coton cardé pour leur permettre l'améliorer le confort de leur nid. De plus une goutte de collyre à visée antalgique est appliquée systématiquement après injection dans le sinus rétro-orbitaire, pour les prélèvements à la queue, de la pommade antalgique est appliquée 30 min avant les prélèvements.

Réduction : Le maximum de tests biologiques post mortem sont prévus pour chaque animal. Le nombre prévu de souris pour le projet est réduit au minimum nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement significatifs.

Ce projet nécessitera 220 souris au maximum.

8221 L'objectif de ce projet est d'étudier les capacités de la glycéolline, coproduit du soja, à inhiber le développement de tumeurs mammaires humaines greffées sur un modèle souris.

Les œstrogènes et l'œstradiol (E2) en particulier, sont des hormones bien connues pour synchroniser la fonction de reproduction chez les femmes. Mais, elles peuvent aussi favoriser certaines pathologies notamment le cancer hormono-dépendant du sein, cancer le plus fréquemment observé chez les femmes en France (plus de 53 000 nouveaux cas chaque année) et première cause de décès par cancer (près de 12 000 décès par an). Découvrir de nouvelles molécules capables de freiner ou d'empêcher le développement de ces tumeurs est ainsi un véritable enjeu de société.

Certains constituants du soja (la génistéine, la daidzéine, la glycéolline...) sont de bons candidats pour relever ce défi. Diverses vertus leur sont attribuées (propriété anti-oxydante, anti-inflammatoire, œstrogéniques ou anti-œstrogéniques voire anti-cancéreuse). Parmi ces composés, la glycéolline apparaît être un excellent candidat.

Nos résultats obtenus *in vitro* indiquent que la glycéolline inhibe la prolifération de cellules tumorales mammaires. Cette inhibition s'accompagne d'une diminution de l'expression de gènes impliqués dans la progression du cycle cellulaire et d'une augmentation d'autres gènes impliqués dans l'arrêt de la croissance cellulaire. *In vivo* chez la souris, nous avons montré que cette molécule exerce également un effet anti-œstrogénique plus spécifiquement dans la glande mammaire.

Ces résultats indiquent donc que la glycéolline diminue la prolifération du tissu mammaire et confirment ainsi leur potentiel pour la lutte et/ou la prévention contre le cancer hormono-dépendant du sein.

Bien que nos premiers résultats soient prometteurs, il apparaît indispensable de confirmer ces propriétés dans un contexte physiopathologique intégré. L'objectif de ce projet est de valider l'effet de la glycéolline *in vivo* sur un modèle de xénogreffes de tumeur mammaire humaine chez la souris.

Nous utiliserons pour cette étude des souris Nude, modèle couramment utilisé pour des expériences de xénogreffes de tumeurs humaines. Les souris seront ovariectomisées afin de nous affranchir de toute influence d'œstrogènes endogènes et équipées d'implants sous-cutanés délivrant des quantités contrôlées d'E2. Ceci est indispensable pour assurer la croissance des tumeurs mammaires. Les cellules tumorales mammaires humaines seront greffées directement dans une des glandes mammaires.

Nous prévoyons d'utiliser au total 40 souris pour ce projet : Une étude préliminaire sera réalisée sur 8 souris et permettra de choisir la lignée et la concentration cellulaire à greffer. Par la suite, la croissance tumorale en présence de glycéolline sera comparée à celle obtenue en absence de traitement (contrôle). Pour ce faire, nous constituerons 2 lots de 8 souris (1 lot traité à la glycéolline et 1 lot contrôle). En fonction de la variabilité des effets observés, nous envisageons, si nécessaire, de répéter le protocole une fois afin de confirmer les effets observés.

Ce protocole respectera la règle des 3R :

- Réduire : Les variations inter-individus et inter-expérimentations imposent l'utilisation d'un nombre minimum d'animaux. Nous suivrons les recommandations établies par l'OCDE (Organisation de Coopération et de Développement Economiques) pour tester *in vivo* les composés chimiques qui préconise d'utiliser huit animaux par lot.

- Raffiner : Dès leur réception dans notre animalerie, les animaux seront répartis par lots, dans un environnement enrichi, et manipulés chaque jour par les expérimentateurs afin de limiter le stress lié aux conditions d'hébergement et d'évaluer quotidiennement l'état de bien-être des animaux et d'appliquer les points limites s'ils présentent des signes de souffrance. Les animaux seront anesthésiés durant les gestes techniques qui le nécessitent.

- Remplacer : Très peu de données existent sur les effets de la glycéolline in vivo et l'étude sur l'animal est un prérequis indispensable pour l'utilisation, à plus long terme, de ces molécules pour la santé animale et humaine. En amont, des études in vitro sur différents modèles cellulaires ont été réalisées permettant ainsi d'affiner les conditions expérimentales (notamment les doses) utilisées in vivo.

8222 L'embolisation est une procédure de radiologie qui consiste à injecter à l'intérieur d'un vaisseau un produit qui va occlure ce vaisseau. Le but visé est soit d'arrêter un saignement soit de dévasculariser un tissu pathologique irrigué par ce vaisseau pour rendre possible une ablation chirurgicale sans risque d'hémorragie quelque temps après l'embolisation. Plusieurs agents d'embolisation sont disponibles et peuvent notamment être classés selon leur caractère temporaire ou permanent. Les avantages des agents temporaires (résorbables) tiennent en leur élimination en quelques jours/semaines permettant de préserver les zones saines autour des lésions pathologiques ou d'effectuer une seconde injection après leur dégradation si nécessaire. Pour les agents les plus récents, synthétiques et dans lesquels on peut charger des médicaments, la durée de dégradation peut être ajustée par la composition de la particule. On peut ainsi choisir après combien de temps le vaisseau sera à nouveau ouvert ou la période pendant laquelle le médicament va être libéré.

L'objectif du projet est d'étudier la durée d'occlusion et les effets à court/moyen terme d'agents d'embolisation résorbables.

Les essais réalisés pourront faire partie des dossiers réglementaires pour les demandes d'autorisation de mise sur le marché aux USA et en Europe.

Les tests doivent être réalisés dans les mêmes conditions que chez l'homme. Ils sont par conséquent effectués sur des animaux de grande taille (mouton). L'injection des produits est faite dans l'artère rénale. Les animaux étudiés dans ce projet proviennent de centres agréés et sont nés/élevés en captivité. L'étude portera sur un nombre maximum de 27 animaux, pour une période de 3 ans. On testera 4 agents d'embolisation différents, chacun injecté à 6 animaux. On prévoit 3 animaux supplémentaires en cas d'échec de la procédure. Pour chaque produit, 3 animaux seront euthanasiés 7 jours et 3 animaux seront euthanasiés 28 jours après injection.

Principe des 3R :

- Remplacement : Un certain nombre de conditions du vivant ne peuvent être modélisées dans des systèmes in vitro : contact avec le sang, déformation des vaisseaux, réaction tissulaire et dégradation des produits, réouverture des vaisseaux, ce qui implique le recours à l'animal vivant.
- Réduction : L'estimation du nombre d'animaux utilisé est basée sur le nombre d'animaux nécessaire pour réaliser une analyse statistique pertinente des données. Ce nombre est classiquement de 3 par produit et condition. Les deux reins de l'animal sont traités et les prélèvements sur chaque rein sont multipliés pour réduire le nombre total d'animaux utilisés.
- Raffinement : La procédure d'embolisation est réalisée sous anesthésie générale. Des analgésiques, antibiotiques et anti-inflammatoires seront administrés systématiquement au moment des procédures et occasionnellement pendant la période de suivi de 28 jours si l'état de l'animal l'impose. Un protocole de suivi des animaux avec observation quotidienne et analyses sanguines sont utilisés pour évaluer et réduire au maximum la douleur animale. Les animaux sont logés par groupes sociaux de 3-4 individus sur lit de paille.

8223 L'oreille joue un rôle majeur dans la localisation des sources sonores. L'audition chez les amphibiens anoures, les grenouilles, a été très étudiée mais comprendre la directivité auditive des anoures pose un formidable défi scientifique. En effet, malgré de nombreuses études, certains mécanismes fondamentaux du fonctionnement de l'oreille restent inconnus. Par exemple, certaines grenouilles localisent des sons dont les longueurs d'ondes sont plus grandes que leurs dimensions corporelles.

Lors de nos travaux antérieurs nous avons ainsi pu montrer que le son peut entrer dans l'oreille par de multiples voies. Dans ce projet nous proposons d'étudier ces mécanismes physiologiques d'audition et de localisation spatiale grâce à la combinaison de techniques d'imagerie non-invasive extrêmement perfectionnées, basées sur l'utilisation de scanner ou d'échographe.

Remplacement : le projet portant sur l'étude de la réponse physiologique d'un organe entier et de tissus complexes, il nous est impossible de remplacer l'animal vivant par un modèle ou par des simulations numériques.

Réduction : Le nombre d'animaux utilisé a été évalué afin d'échantillonner la variabilité entre individus de la même espèce. Le nombre d'espèces différentes a lui aussi été évalué afin de créer une base de données suffisante pour la compréhension des phénomènes observés. Cela nous a permis de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en gardant suffisamment pour ne pas compromettre la validité des expériences. Au final, le nombre minimum d'animaux permettant de réaliser l'expérience sans compromettre les objectifs du projet sera ainsi utilisée. Dans ces conditions le nombre maximal d'animaux nécessaire à l'intégralité de ce projet est de 200.

Raffinement : L'état de santé des animaux sera surveillé tout au long des expériences. Cela nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Aucune procédure expérimentale ne fera appel à de la chirurgie ou ne dépassera l'équivalent d'une injection par piqûre, que ce soit pour l'anesthésie ou pour l'euthanasie. Les animaux à la fin de l'expérience seront euthanasiés pour des études anatomiques.

8224 La résistance des cellules cancéreuses aux chimiothérapies classiques nous pousse à rechercher de nouvelles approches thérapeutiques. Comme les cellules cancéreuses sont généralement plus vulnérables au stress oxydant que les cellules saines, nous avons imaginé qu'en faisant varier l'équilibre oxydo-réducteur, nous pourrions éliminer les cellules cancéreuses, notamment les plus résistantes aux traitements classiques. Nous avons donc mis au point deux combinaisons de différentes molécules permettant à la fois d'exacerber le stress oxydant et d'inhiber les systèmes biochimiques dont ces cellules disposent pour maintenir leur équilibre oxydo-réducteur. Nous espérons, grâce à l'utilisation de ces deux combinaisons, éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses et démontrer ainsi la faisabilité de notre stratégie thérapeutique.

Règle des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner) –

1/ Remplacer les animaux : Pour des raisons scientifiques et éthiques, nous répondons au plus grand nombre de questions à l'aide d'expériences réalisées in vitro. Le recours à l'expérimentation animale est cependant indispensable pour confirmer et valider nos résultats. En effet, nos données obtenues in vitro révèlent un effet anticancéreux de ces combinaisons sur des lignées de cancer de sein très agressives. Il est donc primordial pour nous de valider cet effet sur un modèle animal avant d'envisager une étude translationnelle. 2/ Réduire le nombre de souris utilisées : Un nombre minimum d'animaux est nécessaire dans chaque lot afin de pouvoir valider les résultats de façon statistique. Nous récupérerons un maximum de données sur une même souris (vitesse d'apparition de la tumeur, taille de tumeur, purification des cellules issues de la tumeur). Cette méthode nous permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées, tout en préservant la qualité de la recherche menée.

3/ Raffiner les méthodes : Lors de l'injection des cellules cancéreuses, les souris sont anesthésiées puis remises en groupes pour le réveil (durée de l'intervention : quelques minutes). Chaque souris ne subit qu'une seule injection de cellules au cours de sa vie. Le développement tumoral est observé tous les 2 à 3 jours et les souris sont euthanasiées dès qu'un signe de douleur, angoisse, souffrance est détecté. Si aucun signe n'est détecté, c'est le volume de la tumeur qui conditionne l'euthanasie. Globalement ces expériences nécessiteront 354 souris.

8225 Ce projet vise à étudier les mécanismes épigénétiques (c'est à dire qui régulent l'activité des gènes sans modification de la séquence de l'ADN) qui déterminent la différenciation des cellules du système immunitaire lors d'une réponse immunitaire contre une infection bactérienne et contre des tumeurs. Il intègre des problématiques de dynamique de la chromatine (structure au sein de laquelle se trouve l'ADN dans le noyau des cellules) et des questions d'immunologie fondamentale et appliquée. Parmi

les cellules du système immunitaire, nos travaux porteront principalement sur les lymphocytes T. Ces cellules sont activées par les antigènes infectieux ou tumoraux, prolifèrent, se différencient en cellules effectrices, puis en cellules mémoires qui peuvent survivre jusqu'à des dizaines d'années. Ces cellules mémoires assurent la protection contre des nouvelles infections par les mêmes pathogènes, et dans certaines circonstances contre le cancer.

Les réponses immunitaires anti-infectieuses et anti-tumorales seront analysées dans des souris modifiées génétiquement pour l'expression de certaines molécules impliquées dans ces voies de régulation.

Le projet va étudier les mécanismes de contrôle épigénétique de la mise en place de ces fonctions des lymphocytes T et leurs conséquences sur les réponses immunitaires. D'après des résultats obtenus lors d'expériences réalisées *in vitro*, il est nécessaire d'évaluer ces mécanismes dans un système animal vivant intégré tel que la souris. Les expériences utilisant des modèles animaux proposées vont permettre d'identifier les mécanismes intégrés de défense immunitaire qui en résultent. Les découvertes que nous ferons dans ce cadre seront directement applicables dans le domaine de la vaccination, aussi bien contre les infections que contre le cancer.

Pour l'ensemble du projet, le nombre de souris nécessaires faisant l'objet de la présente demande sera de 1272 animaux. Toutes les précautions seront prises pour réduire le nombre d'animaux utilisés, tout en assurant une valeur significative des résultats obtenus. En accord avec les recommandations internationales dans le domaine de la cancérologie, les animaux sont suivis quotidiennement afin d'assurer leur bien-être et les expérimentations sont arrêtées avant la souffrance des animaux selon des points limites listés dans une grille de score. De plus, toutes les mesures seront mises en œuvre pour réduire l'inconfort des animaux (réhydratation, prélèvements sanguins sous anesthésie).

8226 Ce projet s'intéresse au rôle du microenvironnement immunitaire du foie en physiologie normale et au cours de la tumorigénèse hépatique. La tumorigénèse s'accompagne en effet de modifications des cellules immunitaires au voisinage des cellules tumorales. Nous allons étudier le dialogue fonctionnel entre les hépatocytes et les cellules du système immunitaire. Nous cherchons à comprendre les conséquences de la prolifération des hépatocytes sur les populations de cellules lymphoïdes présentes dans le foie et sur leur dialogue avec les autres populations immunes. Les désordres métaboliques qui sont souvent associés à la progression tumorale seront également évalués dans cette optique.

Ce projet repose sur l'analyse d'interactions cellulaires au sein d'un organe complet, et plus largement dans un organisme entier. Il nécessite donc l'utilisation d'animaux vivants. La souris est un modèle de choix en raison de la possibilité d'analyser de nombreux modèles de souris transgéniques. Comme il n'est pas encore possible de recréer un microenvironnement immunitaire en dehors d'un organe, l'utilisation de modèles murins représente la meilleure approche pour répondre à nos questions. Nous utiliserons 3 modèles prénéoplasiques et deux modèles tumoraux. Nous prévoyons d'utiliser un total de 808 souris sur les 5 ans du projet pour mener à bien cette étude. Les nombres ont été calculés au plus juste pour permettre toutefois d'obtenir la puissance statistique nécessaire. Nous avons deux types de modèles, ceux présentant des prénéoplasies dans le foie mais ne possèdent pas de tumeur, ainsi pour ces modèles, le niveau de sévérité des procédures est léger et modéré et l'état des souris sera surveillé par une pesée, la diminution de l'agilité des animaux dans la cage, l'état du pelage et la prostration des animaux. La souffrance des modèles prénéoplasiques (non tumoraux) est évaluée en définissant précisément un point limite obtenu par combinaison de 4 principaux critères d'évaluation de la souffrance animale. Pour les modèles présentant des foyers tumoraux avec nodules dans le foie, le niveau de sévérité des procédures est considéré modéré. Aucune métastase ne se développe chez ces modèles. Lors de ces expériences, le point limite sera l'apparition d'un seul critère d'évaluation de la douleur.

8227 De par la loi, et en particulier selon le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals), les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation. En fonction du tonnage de la substance considérée, si des essais s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests à utiliser sont décrits dans les textes et s'appuient sur les lignes

directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour les essais de produits chimiques. Ainsi, pour des substances fabriquées ou importées en quantités égales ou supérieures à 10 tonnes (Annexe VIII du règlement REACH), des informations standards issues du test de dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement sont exigées. Cette demande d'autorisation porte sur l'étude du dépistage de la toxicité pour la reproduction et le développement décrite dans la ligne directrice OCDE 421 adoptée le 27 Juillet 1995. Pour ce type d'étude, le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement). En l'absence de données issues d'autres essais de toxicité pour la reproduction et le développement, des résultats positifs sont utiles à une évaluation initiale du danger et permettent de juger de la nécessité ou non de procéder à d'autres essais (réduire). Une étude nécessite 80 animaux. La demande d'autorisation porte sur une durée de cinq ans, avec une prévision de deux études par an, soit un nombre maximum de 160 rats/an (ou 800 rats sur 5 ans).

Chaque animal sera quotidiennement observé au plan clinique. Les points limites ont été définis suivant les recommandations de l'OCDE, et les actions correctives permettant de limiter au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse, déterminées selon la nature et la gravité des signes qui pourront être observés. Un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement). La substance d'essai sera administrée à des doses graduées (3 doses + 1 témoin) à plusieurs groupes de mâles et de femelles (n=10 animaux/groupe). La durée d'une étude sera de 54 jours et comprendra 14 jours de pré-accouplement, un maximum de 14 jours pour l'accouplement, 22 jours de gestation et 4 jours de lactation.

8228 Les cyclodextrines (CD) sont des dérivés d'amidon généralement utilisés comme excipient de formulation dans les médicaments et dans l'agroalimentaire. De récentes études ont montré que les cyclodextrines peuvent améliorer les signes cliniques observés chez des souris modèles de maladies neurodégénératives et notamment des modèles de la maladie d'Alzheimer (MA).

Le présent projet a pour but d'étudier de façon plus précise et systématique le rôle d'une dérivée des cyclodextrines, le MD1105 dans deux modèles de souris qui répliquent chacun un type de lésions présentes dans les cerveaux de patients atteints de MA (dépôts amyloïdes dans l'espace extracellulaire, et dégénérescences neurofibrillaires des neurones). Des études préliminaires de toxicité aiguë et chronique ont permis d'évaluer les doses de la drogue sans effet secondaires pour son utilisation chez la souris.

Nous examinerons l'action du MD1105 à plusieurs niveaux (comportement, anatomie) dans deux différents modèles de souris. Ce projet (pour lequel il n'existe pas d'alternative in vitro) reposera sur l'utilisation de 96 souris (48 souris par modèle de lésion) afin de constituer des groupes d'études avec des effectifs suffisants pour établir des résultats expérimentaux fiables (critère de Réduction). Les expériences réalisées chez la souris génétiquement modifiée, qui est le modèle animal le plus classique et robuste de pathologie Alzheimer (critère de Remplacement), seront non-invasives et peu traumatisantes (critère de Raffinement) et reposeront essentiellement sur des tests comportementaux (évaluation de la mémoire dans des labyrinthes). Enfin, ce projet permettra potentiellement de définir de nouvelles voies de recherche thérapeutiques dans le domaine de la maladie d'Alzheimer.

8229 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer l'innocuité des substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementation Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals - REACH) et tous les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval, y compris les distributeurs, ont l'obligation de classer leurs substances et mélanges dangereux (réglementation Classification, Labelling, Packaging - CLP). Les tests à utiliser sont décrits dans les textes et s'appuient sur les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour les essais de produits chimiques. La voie d'exposition probable à la substance conditionne le type de test à effectuer. Ainsi, lorsque l'exposition par voie dermique est probable, les risques résultant d'une exposition de courte durée par voie dermique doivent être évalués.

Cette demande d'autorisation porte sur l'étude de la toxicité cutanée aiguë telle que décrite dans la ligne directrice OCDE 402, adoptée le 24 février 1987. Pour ce type d'étude, le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement). Ce type d'étude constitue une étape initiale dans l'établissement d'un plan d'administration des doses pour les recherches de la toxicité subchronique (réduire) et fournit des informations sur l'absorption dermique et sur le mode d'action toxique d'une substance par cette voie. Une étude complète de classification utilisera donc 15 animaux (3 groupes de 5 femelles) ou 10 animaux en cas d'essai limite (5 mâles et 5 femelles).

La demande d'autorisation porte sur une durée de cinq ans, avec une prévision de cinq études par an, soit un nombre maximum de rats utilisés sur cette période égal à 375. Au cours des études, un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

Les substances à tester seront appliquées de façon uniforme sur une surface représentant 10% de la surface totale corporelle. Elles seront maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non-irritant pendant une période d'exposition de 24h. Le lieu d'application sera ensuite recouvert de manière à maintenir le pansement de gaze et ainsi éviter que les animaux ingèrent la substance. A l'issue de l'exposition, les animaux seront suivis durant un minimum de 14 jours sur le plan clinique puis euthanasiés pour un examen macroscopique interne. Toutefois, cette durée est fonction des réactions toxiques, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération. Les données recueillies doivent permettre l'établissement d'une courbe dose-réponse et, si possible, une détermination de la DL 50 par une méthode acceptable.

8230 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementation Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals dite REACH) et tous les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval y compris les distributeurs ont l'obligation de classer leurs substances et mélanges dangereux (réglementation Classification, Labelling, Packaging dite CLP). Si des essais s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests s'appuient sur les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour les essais de produits chimiques. Les substances susceptibles d'être ingérées doivent faire l'objet d'études de toxicité par voie orale et en premier lieu, une étude de la toxicité orale aiguë.

Cette demande d'autorisation porte sur l'étude de la toxicité orale aiguë – Méthode par classe de toxicité aiguë, telle que décrite dans la ligne directrice OCDE 423, adoptée en Mars 1996, et révisée le 17 décembre 2001. La demande d'autorisation porte sur une durée de cinq ans, avec une prévision de cinq études par an. Une étude complète de classification utilisera entre 6 (1 dose) et 24 rats (4 doses), soit un nombre maximum de rats utilisés égal à 600.

Pour chaque étude, 1, 2, 3 ou 4 doses, parmi les valeurs proposées par la ligne directrice (5, 50, 300 et 2000 mg/kg), seront testées pour permettre la classification. La dose initiale sera choisie parmi les 4 valeurs proposées par la ligne directrice en fonction des données connues sur le produit à tester. Sans données connues, la dose initiale sera de 300 mg/kg tel que recommandé par la ligne directrice 423. Pour chaque dose, le traitement se fait de façon séquentielle comme décrit dans les annexes de la ligne directrice OCDE 423 : 3 rats femelles sont traités et en fonction de la mortalité observée 3 autres femelles sont traitées avec la même dose ou avec une dose inférieure. Les doses suivantes seront choisies en fonction de la mortalité observée à la concentration initiale ou précédente. Après traitement, les animaux présentant des signes de souffrance seront observés pendant une période prolongée et/ ou répétée afin de suivre l'évolution de ces signes post exposition. Le suivi clinique des animaux (signes de toxicité et/ou de souffrance, poids corporels) sera réalisé pendant 14 jours. A l'issue des 14 jours d'observation ou s'ils présentent des signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés, et un examen macroscopique interne sera réalisé afin de déterminer les éventuelles atteintes internes. Un délai d'au moins 3 jours est respecté entre chaque dose testée, pour s'assurer de l'absence de mortalité avant de tester la dose supérieure. Ce délai peut être plus long, en cas d'observations de signes de toxicité, en concertation avec le vétérinaire référent et les responsables du bien-être animal. L'expérimentation se terminera quand la substance aura pu être catégorisée.

Le point de mesure principal étant la mortalité, les signes cliniques de souffrance monitorés servent à prendre la décision d'euthanasier des animaux dont la mort prochaine est certaine, avant celle-ci. En complément des signes entraînant une euthanasie de l'animal (coma, tremblements, perte de poids > 15% en 24h ou >20% sur 3 jours consécutifs), la persistance des signes de souffrance (ex : prostration, froid au toucher, respiration abdominale) est surveillée, notée avec précision, et entraîne l'euthanasie, si une amélioration n'est pas observée après 48h et suivant décision par le directeur d'étude, en consultation avec le vétérinaire référent et le (ou les) responsable(s) du bien-être animal.

Règles des 3R :

Le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement).

Le schéma expérimental est basé sur un processus séquentiel où le traitement à une dose supérieure ou inférieure dépend de la mortalité observée chez les animaux traités à la concentration initiale ou précédente (réduction).

Un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

8231 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementation Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals dite REACH) et tous les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval y compris les distributeurs ont l'obligation de classer leurs substances et mélanges dangereux (réglementation Classification, Labelling, Packaging dite CLP). Si des essais s'avèrent nécessaires pour caractériser les dangers, les tests s'appuient sur les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour les essais de produits chimiques. Les substances susceptibles d'être ingérées doivent faire l'objet d'études de toxicité par voie orale et en premier lieu, une étude de la toxicité orale aiguë.

Cette demande d'autorisation porte sur l'étude de la toxicité orale aiguë – Méthode par classe de toxicité aiguë, telle que décrite dans la ligne directrice OCDE 423, adoptée en Mars 1996, et révisée le 17 décembre 2001. La demande d'autorisation porte sur une durée de cinq ans, avec une prévision de 3 études par an. Une étude complète de classification utilisera entre 6 (1 dose) et 24 animaux (rats ou souris) (4 doses), soit un nombre maximum d'animaux utilisés égal à 360.

Pour chaque étude, 1, 2, 3 ou 4 doses, parmi les valeurs proposées par la ligne directrice (5, 50, 300 et 2000 mg/kg), seront testées par voie orale pour permettre la classification. Le choix du mode d'administration dépend du produit à tester. Généralement, le produit est administré par gavage. Cependant l'administration par gavage nécessite que le produit soit soluble dans le véhicule (le plus souvent dans de l'eau) ou qu'au moins une suspension homogène et stable soit obtenue. Dans le cas contraire, l'administration via un complément alimentaire (solide) sera mise en place. Sans données connues, la dose initiale sera de 300 mg/kg tel que recommandé par la ligne directrice 423.

Pour chaque dose, le traitement se fait de façon séquentielle comme décrit dans les annexes de la ligne directrice OCDE 423 : 3 rats femelles sont traités et en fonction de la mortalité observée 3 autres femelles sont traitées avec la même dose ou avec une dose inférieure. Les doses suivantes seront choisies en fonction de la mortalité observée à la concentration initiale ou précédente. Après traitement, les animaux présentant des signes de souffrance seront observés pendant une période prolongée et/ ou répétée afin de suivre l'évolution de ces signes post exposition. Le suivi clinique des animaux (signes de toxicité et/ou de souffrance, poids corporels) sera réalisé pendant 14 jours. A l'issue des 14 jours d'observation ou s'ils présentent des signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés, et un examen macroscopique interne sera réalisé afin de déterminer les éventuelles atteintes internes. Un délai d'au moins 3 jours est respecté entre chaque dose testée, pour s'assurer de l'absence de mortalité avant de tester la dose supérieure. Ce délai peut être plus long, en cas d'observations de signes de toxicité, en concertation avec le vétérinaire référent et les responsables du bien-être animal. L'expérimentation se terminera quand la substance aura pu être catégorisée.

Le point de mesure principal étant la mortalité, les signes cliniques de souffrance monitorés servent à prendre la décision d'euthanasier des animaux dont la mort prochaine est certaine, avant celle-ci. En complément des signes entraînant une euthanasie de l'animal (coma, tremblements, perte de

poids > 15% en 24h ou >20% sur 3 jours consécutifs), la persistance des signes de souffrance (ex : prostration, froid au toucher, respiration abdominale) est surveillée, notée avec précision, et entraîne l'euthanasie, si une amélioration n'est pas observée après 48h et suivant décision par le directeur d'étude, en consultation avec le vétérinaire référent et le (ou les) responsable(s) du bien-être animal.

Règles des 3R :

Le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement). Dans certains cas, la souris pourra être choisie à la place du rat, si des données montrent que la souris est plus sensible que le rat par rapport au produit chimique testé. Par exemple, quand il s'agit d'un mélange et qu'au moins pour l'un des constituants, il est reconnu que la souris est plus sensible que le rat.

Le schéma expérimental est basé sur un processus séquentiel où le traitement à une dose supérieure ou inférieure dépend de la mortalité observée chez les animaux traités à la concentration initiale ou précédente (réduction).

Un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

8232 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer qu'ils maîtrisent les risques liés aux substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementation REACH : enregistrement, évaluation et autorisation des produits chimiques — en anglais : Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals) et tous les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval y compris les distributeurs ont l'obligation de classer leurs substances et mélanges dangereux (réglementation CLP : en anglais : Classification, Labelling, Packaging, règlement européen relatif à la classification, à l'étiquetage et à l'emballage des substances chimiques et des mélanges). Les substances susceptibles d'être inhalées doivent faire l'objet en premier lieu, d'une étude de la toxicité aiguë par inhalation.

Cette demande d'autorisation porte sur l'étude de la toxicité aiguë par inhalation – Méthode par classe de toxicité aiguë, telle que décrite dans la ligne directrice OCDE 436, adoptée le 7 septembre 2009. Le projet porte sur une durée de 5 ans, avec une prévision de 5 études par an. Une étude complète de classification utilisera entre 6 et 24 rats, soit un nombre maximum de rats utilisés égal à 600.

Pour chaque étude, 1, 2, 3 ou 4 concentrations, parmi les valeurs proposées par la ligne directrice, seront testées pour permettre la classification. Pour chaque concentration, 3 rats mâles et 3 rats femelles (ou 6 rats du genre le plus sensible) seront exposés pendant 1, 2 ou 4 heures à une substance ou à un mélange sous forme de gaz, de vapeur, d'aérosol ou à une atmosphère mixte (gaz + aérosol) dans un système corps entier ou dans un système d'exposition nez-seul. La concentration d'exposition initiale sera choisie parmi les 4 valeurs proposées par la ligne directrice, selon qu'il s'agit d'un gaz, de vapeurs ou d'un aérosol, en fonction de la toxicité attendue du produit. Les concentrations suivantes seront choisies en fonction de la mortalité observée à la concentration initiale ou précédente. Si au moins 3 animaux sont retrouvés morts ou euthanasiés avant la fin de l'étude, la concentration inférieure à la concentration initiale ou précédente sera ensuite testée. Sinon, c'est la concentration supérieure qui sera testée. Après l'exposition, les animaux présentant des signes de souffrance seront observés pendant une période prolongée et/ ou répétée afin de suivre l'évolution de ces signes post exposition. Le suivi clinique des animaux (signes de toxicité et/ou de souffrance, poids corporels) sera réalisé pendant 14 jours. A l'issue des 14 jours d'observation ou s'ils présentent des signes de souffrance, les animaux seront euthanasiés, et un examen macroscopique interne sera réalisé afin de déterminer les éventuelles atteintes internes.

Règles des 3R :

Le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement).

Le schéma expérimental est basé sur un processus séquentiel où l'exposition à une concentration supérieure ou inférieure dépend de la mortalité observée chez les animaux exposés à la concentration initiale ou précédente. Chaque exposition est réalisée sur 6 animaux au lieu de 10 animaux (ligne directrice OCDE n°403) (réduction).

Un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

8233 De par la loi, les industriels et les importateurs doivent démontrer l'innocuité des substances chimiques qu'ils utilisent avant leur mise sur le marché ou leur utilisation (réglementation Registration, Evaluation, Authorization and restriction of CHemicals - REACH) et tous les fabricants, importateurs et utilisateurs en aval, y compris les distributeurs, ont l'obligation de classer leurs substances et mélanges dangereux (réglementation Classification, Labelling, Packaging - CLP). Les tests à utiliser sont décrits dans les textes et s'appuient sur les lignes directrices de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour les essais de produits chimiques. La voie d'exposition probable à la substance conditionne le type de test à effectuer. Ainsi, lorsque l'exposition par voie dermique est probable, les risques résultant d'une exposition de courte durée par voie dermique doivent être évalués.

Cette demande d'autorisation porte sur l'étude de la toxicité cutanée aiguë telle que décrite dans la ligne directrice OCDE 402, adoptée le 24 février 1987.

Pour ce type d'étude, le rat, mammifère reconnu comme moins sensible que le singe ou le chien mais permettant d'obtenir des résultats fiables, a été choisi (remplacement). Dans certains cas, la souris pourra être choisie à la place du rat, si des données montrent que la souris est plus sensible que le rat par rapport au produit chimique testé. Par exemple, quand il s'agit d'un mélange et qu'au moins pour l'un des constituants, il est reconnu que la souris est plus sensible que le rat.

Ce type d'étude constitue une étape initiale dans l'établissement d'un plan d'administration des doses pour les recherches de la toxicité sub-chronique (réduire) et fournit des informations sur l'absorption dermique et sur le mode d'action toxique d'une substance par cette voie. Une étude complète de classification utilisera donc 15 animaux (3 groupes de 5 femelles) ou 10 animaux en cas d'essai limite (5 mâles et 5 femelles).

La demande d'autorisation porte sur une durée de cinq ans, avec une prévision de trois études par an, soit un nombre maximum d'animaux utilisés sur cette période égal à 225.

Au cours des études, un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

Les substances à tester seront appliquées de façon uniforme sur une surface représentant 10% de la surface totale corporelle. Elles seront maintenues en contact avec la peau au moyen d'un pansement de gaze poreux et d'un sparadrap non-irritant pendant une période d'exposition de 24h. Le lieu d'application sera ensuite recouvert de manière à maintenir le pansement de gaze et ainsi éviter que les animaux ingèrent la substance. A l'issue de l'exposition, les animaux seront suivis durant un minimum de 14 jours sur le plan clinique puis euthanasiés pour un examen macroscopique interne. Toutefois, cette durée sera fonction des réactions toxiques, de leur vitesse d'apparition et de la longueur de la période de récupération. Les données recueillies devront permettre l'établissement d'une courbe dose-réponse et, si possible, une détermination de la DL50 par une méthode acceptable.

8234 Chaque étude de ce projet a pour but d'évaluer les effets potentiels d'un candidat médicament sur la coordination motrice, et plus spécifiquement si le composé à tester peut altérer le tonus musculaire ou avoir un effet sédatif chez la souris

Le projet consiste à mesurer la capacité de l'animal à se maintenir en équilibre sur un axe en rotation. Un animal qui présente une coordination motrice altérée tombe plus rapidement de l'axe en rotation qu'un animal normal.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 1500 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez la souris car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la coordination motrice. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique

d'un candidat médicament. A ce jour, la souris est l'une des espèces les plus adaptées à ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux et d'éventuels signes cliniques
- le recours à des procédures les moins invasives possibles
- la recherche des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

8235 Les pathologies obstructives des artères coronaires sont une cause majeure de dysfonction cardiaque, menant à des remodelages structurels qui aboutissent à un arrêt cardiaque. Les maladies cardiaques sont dans les nations industrialisées, une étiologie prédominante d'invalidité et de mortalité aussi bien chez l'homme que chez la femme. Le poids du cœur normal varie en fonction de la masse corporelle. L'augmentation de la taille et du poids du cœur accompagne beaucoup de formes de maladies cardiaques et porte le nom d'hypertrophie. La dilatation consiste en une augmentation de la taille d'une cavité cardiaque. Plus spécifiquement, l'insuffisance cardiaque (IC) résulte d'un déséquilibre entre la perfusion et les véritables besoins du cœur en sang oxygéné. Le tissu cardiaque souffre non seulement suite à l'insuffisance en oxygène mais également par la réduction des substrats et une accumulation des métabolites. Dans 90% des cas, la cause de l'insuffisance myocardique est due à une réduction du flux sanguin coronaire suite à l'obstruction d'une artère coronaire par une plaque d'athérosclérose. L'infarctus du myocarde (IM) est la forme la plus importante d'IC dans laquelle la durée et la sévérité de l'ischémie sont suffisantes pour induire la mort du muscle cardiaque. L'occlusion d'une artère coronaire majeure résulte en l'ischémie et la mort cellulaire potentielle dans la zone anatomique du cœur irriguée par cette artère, appelée région à risque. Le remodelage ventriculaire est le processus qui survient suite à un IM aigu. Il englobe, d'une part, la perte de cardiomyocytes par apoptose et nécrose aboutissant à l'espacement des cellules contractiles, et d'autre part, l'amincissement de la paroi du ventricule gauche (VG), mais aussi la dilatation du VG ainsi que l'accumulation de collagène. Ces altérations architecturales complexes surviennent non seulement dans la zone infarctée mais également dans le tissu cardiaque sain après un IM. En effet, des effets compensatoires par hypertrophie, dilatation et hyperkinésie des territoires non ischémiés apparaissent. Bien que ce remodelage cardiaque soit initialement une réponse adaptative, il conduit progressivement à une dilatation menant à une insuffisance cardiaque par congestion.

Remplacement : Des modèles animaux d'IC existent et consistent en une ligature d'une artère coronaire suivie ou non d'une re-perfusion. D'un point de vue anatomique, l'artère coronaire du cœur murin présente davantage de collatérales que celle de l'être humain, ce qui permet de bien cibler la zone à risque en fonction de l'endroit de l'occlusion. Des dosages de biomarqueurs circulants et cytokines chez la souris aideront aux diagnostics et valideront la réussite du modèle. Par conséquent, nous établissons, un modèle minimalement invasif et simple, d'infarctus du myocarde chez la souris par ligature de l'artère coronaire descendante gauche. Ensuite, nous validerons ce modèle par un test d'effort et de mesure de pression intraventriculaire et nous dosons les biomarqueurs et les cytokines circulants suite à l'ischémie.

Pour réaliser ce projet, on ne peut pas remplacer le modèle animal vivant comme la souris à cause de son système circulatoire proche de l'humain et surtout assurer l'information scientifique nécessaire au développement de stratégies thérapeutiques pour les maladies cardiovasculaires.

Réduction : Dans ce protocole, nous souhaiterons utiliser au total 48 animaux. Ces animaux seront répartis en 2 groupes (24 souris contrôles et 24 souris opérées), dans chaque groupe nous utilisons

12 souris mâles et 12 souris femelles. Ce nombre est le minimum acquis pour des résultats statistiquement relevant.

Raffinement : Toutes les procédures sont réalisées sous anesthésie générale. Une attention particulière est mise sur la gestion de la douleur post-opératoire faisant suite à la chirurgie induisant le modèle d'infarctus. Ainsi des antidouleurs de la famille des opiacées et des anti-inflammatoires seront utilisés afin d'éviter toute douleur chez nos animaux.

8236 L'accident vasculaire cérébral (AVC) touche un million de personnes par an dans l'Union Européenne. C'est une maladie grave, dont l'issue est fatale dans un tiers des cas. Les deux tiers des survivants conservent des séquelles, certains devenant dépendants dans leur vie quotidienne. En tant que 3ème cause de mortalité et 1ère cause de handicap acquis chez l'adulte, l'AVC est un enjeu majeur de santé public. L'accident ischémique, qui résulte de l'occlusion d'une artère cérébrale, représente 88% des AVC. Le seul traitement approuvé de l'AVC ischémique est la thrombolyse. Cependant, moins de 5% des patients reçoivent ce traitement, ce qui laisse la vaste majorité des patients sans option thérapeutique. L'inflammation post-AVC représente une cible thérapeutique prometteuse. En effet, les études chez le rongeur ont montré que le fait de limiter l'inflammation diminuait les séquelles dues à l'AVC. Cependant, les quelques études cliniques qui ont évalué l'effet des thérapies anti-inflammatoires dans l'AVC se sont révélées soit négatives, soit peu concluantes. Ainsi, il existe un besoin urgent de nouvelles approches thérapeutiques, associées à des outils diagnostiques compagnons, afin d'assurer une stratification optimale des patients éligibles à ces nouvelles thérapeutiques, ainsi que le suivi non-invasif de leurs effets.

Ce projet, est basé sur le concept novateur d'utiliser le récepteur MAC-1 récepteur exprimée à la surface des cellules immunes comme cible d'imagerie dans l'AVC. Pour cela, nous avons pour objectifs : 1) développer une sonde d'imagerie multimodale (IRM, microscopie intravitale, et scanner spectral) avec des propriétés optimales pour l'imagerie in vivo ; et 2) établir la preuve de concept que l'imagerie de Mac-1 est faisable et utile dans un modèle d'ischémie cérébrale chez la souris. Il n'existe pas de modèles informatiques ou in vitro nous permettant de reproduire l'infarctus qui se veut très proche de la pathologie. Le recours à l'expérimentation sur l'animal de laboratoire (souris) est donc obligatoire.

L'avantage de l'imagerie in vivo est qu'elle permet des études sur l'animal vivant plutôt que d'avoir à euthanasier les animaux à intervalles donnés pour faire la même observation. Chaque animal est son propre contrôle, ce qui permet d'augmenter la puissance statistique des résultats tout en limitant le nombre d'animaux (Réduction), une fois la technique d'imagerie validée. L'imagerie est réalisée sous anesthésie. L'introduction d'agents de contraste est un outil important car ils permettent de faire ressortir le phénomène cellulaire ou moléculaire d'intérêt (inflammatoire). Quand cela est possible, les agents de contraste sont d'abord testés dans un modèle d'ischémie cérébrale in vitro (culture cellulaire de macrophages) (Remplacement). En bref, les mesures suivantes visent à réduire le nombre d'animaux et à raffiner les protocoles :

- La taille des effectifs est calculée a priori, en fonction de l'effet attendu ;
- Les expérimentations sont réalisées en aveugle et en randomisant les produits administrés (agents de contraste et/ou agents thérapeutiques) comme dans les essais cliniques ;
- Les paramètres physiologiques appropriés (poids, température, capnie, respiration, etc.) sont mesurés tout au long du protocole.

Les souris seront suivies quotidiennement et placés dans un environnement conforme aux recommandations Européennes. Les souris qui subiront des chirurgies seront sédatisées et recevront un traitement post-opératoire analgésique afin de diminuer la douleur due à la chirurgie.

L'objectif des développements en méthodologie d'imagerie in vivo est triple :

- 1) Mieux comprendre la physiopathologie de l'AVC ;
- 2) Mieux évaluer de nouveaux traitements anti-inflammatoires au stade préclinique, afin de sélectionner les meilleurs candidats pour les essais cliniques ;

3) Pouvoir proposer, dans quelques années, des agents de contraste utilisables chez l'homme et dont l'imagerie sera un apport pour le diagnostic, la compréhension physiopathologique et l'évaluation thérapeutique de l'AVC.

Au maximum 80 souris pendant 3 ans seront utilisées pour ce projet.

8237 La Rétinopathie Pigmentaire (RP) est une maladie oculaire génétique grave qui touche environ une personne sur 3000 au niveau mondial. Cette maladie se caractérise par une perte progressive de la vision.

La rétinopathie pigmentaire se caractérise sur le plan clinique par une perte progressive des photorécepteurs à bâtonnet suivie de la diminution de fonction des photorécepteurs à cône jusqu'à la cécité.

Les études menées antérieurement par l'équipe sur la RP ont mis en évidence que le gène *Nxn1* codait pour des protéines ayant une fonction protectrice sur les photorécepteurs à cônes, RdCVF « Rod-derived cone viability factor » et RdCVFL. RdCVF sécrété par les bâtonnets médie une activité protectrice sur les cônes en y activant l'entrée du glucose. RdCVFL (thiorédoxine), jouerait quant à lui un rôle protecteur des effets photo-oxydatifs de la lumière sur les bâtonnets et les cônes. L'équipe a aussi démontré que l'injection en sous rétinien de RdCVF et RdCVFL à l'aide d'outils viraux prévenaient la perte d'acuité visuelle des souris rd10 (modèle récessif de RP par mutation spontanée dans le gène *Pde6b*).

Le but de la présente étude est de démontrer le bénéfice de l'injection séquentielle de RdCVF /RdCVFL par deux classes d'outils viraux. La première injection (AAV2/2) stabilise et maintient en vie les cônes, la seconde injection (AAV2/8 ou AAV7M8) permettra une repousse des segments externes des photorécepteurs à cône. Ce projet à une finalité thérapeutique, nous espérons pouvoir restaurer la vision de patients atteints de RP.

Pour cette étude, nous utiliserons le modèle murin de RP précédemment utilisé dans nos études, la souris rd10. L'efficacité du traitement par double injection sera analysée par des mesures d'acuité visuelle (tests optocinétiques) et par des analyses de la structure des couches de la rétine (tomographie par cohérence optique).

Au total 150 animaux seront nécessaires à cette étude incluant les contrôles. Le nombre d'animaux par groupe est le minimum requis pour obtenir des résultats interprétables et atteindre l'objectif scientifique défini dans ce projet.

L'utilisation du modèle animal est indispensable pour cette étude. L'acuité visuelle ne peut être mesurée par des tests in vitro. Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les conditions d'hébergement seront adaptées au modèle expérimental. Les animaux disposent d'eau et de nourriture à volonté mais pas d'enrichissement. L'enrichissement ralentit l'évolution de la dégénérescence des photorécepteurs de notre modèle animal, et devient donc une variable difficilement quantifiable. Il entraînerait donc une augmentation du nombre d'animaux nécessaire pour obtenir des résultats statistiquement interprétable, ce qui est contraire au principe de réduction décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les animaux seront examinés quotidiennement par le personnel qualifié de l'animalerie et/ou les expérimentateurs. Les rongeurs bénéficieront si besoin d'une anesthésie gazeuse ou par injection.

8238 La voie respiratoire est une voie majeure d'exposition non intentionnelle chez l'Homme. De nombreuses substances sont susceptibles d'être inhalées, qu'elles soient sous forme de gaz, vapeurs, aérosols ou particules. L'évolution constante des procédés industriels peut être à l'origine de nouvelles substances nécessitant d'être caractérisées sur le plan toxicologique pour prévenir les risques pour la santé humaine. Citons par exemple les nanoparticules, de taille inférieure à 100 nm, qui sont de plus en plus utilisées dans de nombreux procédés industriels et participent à la composition d'une grande variété de produits utilisés dans la vie courante (crèmes solaires, textiles, aliments, domaine des transports, etc.).

L'objectif de ce projet est triple : 1) mieux définir et connaître la toxicité pulmonaire de composés potentiellement inhalables, en utilisant un modèle animal reconnu pour ce genre d'études (le rat), 2) contribuer à l'harmonisation des méthodes d'évaluation de la toxicité des substances inhalées,

notamment nano particulières, à des fins réglementaires. 3) valider des modèles in vitro prédictifs pour l'évaluation de la toxicité par inhalation. Pour ce 3ème objectif, une partie importante du projet consiste à utiliser les données générées chez l'animal pour valider une méthodologie in vitro permettant de prédire une toxicité pulmonaire in vivo, et ainsi réduire le recours à l'expérimentation animale.

L'étude complète d'une substance administrée par voie respiratoire fera appel à des expositions à court et moyen-terme et caractérisera les effets en fonction des doses reçues. La réversibilité des éventuels effets observés sera également étudiée.

Pour une substance donnée, selon le mode d'administration envisagé (inhalation ou instillation), une étude complète utilisera entre 216 et 360 rats au maximum. Sur la durée du projet (5 ans), il est prévu d'étudier au plus 10 substances ou mélanges de substances différents, soit un nombre maximum de rats égal à 3600.

Les mesures prises en vue de respecter le principe des 3Rs sont les suivantes : Le rat est l'espèce de choix pour ce type d'études de toxicologie. En raison de la complexité des processus physiologiques mis en œuvre (génétoxicité indirecte due à du stress oxydant et/ou de l'inflammation), les études chez l'animal de laboratoire ne peuvent pas encore être substituées par des études sur des modèles in vitro (remplacement).

Par ailleurs, un grand nombre de paramètres biologiques (inflammation, stress oxydant, toxicité génétique, bio-distribution) sera évalué sur les mêmes animaux (réduction).

Au cours des études, des procédures d'analgésie seront mises en œuvre si nécessaire, pour limiter/supprimer la douleur et un enrichissement du milieu de stabulation (litière permettant de nidifier, fond sonore musical) sera effectué pour favoriser le bien-être des animaux (raffinement).

8239 L'utilisation de dispositifs médicaux (DM) a permis d'améliorer significativement la santé et la qualité de vie des patients. Ces dispositifs médicaux ne permettent pas d'échapper aux risques d'infection et encore moins de les résoudre. Les infections relatives à la pose d'implants en chirurgie sont des problèmes cliniques sérieux induisant un taux de mortalité élevé. Les bactéries responsables de ces infections sont dans plus de 50% des cas *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*. Le traitement consiste à remplacer l'implant et à administrer un antibiotique oral pendant une longue période. Cependant, les protocoles de traitement antibiotique standards présentent une faible efficacité pour ce genre d'affections et l'intervention chirurgicale est souvent complexe pour éliminer l'infection, voire de changer d'implant. Ces pratiques représentent un risque élevé pour le patient et un coût non négligeable pour la société. En effet, les bactéries se fixent sur ces matériaux et les antibiotiques par voie orale restent donc inefficaces. C'est pour cette raison qu'un système local de délivrance de médicament est une alternative intéressante pour pallier ces difficultés. De tels systèmes existent déjà mais sont basés soit sur la dissolution d'antibiotiques dans des ciments et leur délivrance par un phénomène de diffusion, soit par leur dispersion dans des matrices polymères biodégradables. Les désavantages de telles approches sont : la délivrance continue du médicament et une quantité non négligeable d'antibiotiques reste piégée dans les réseaux polymères. La libération d'antibiotiques est contrôlée par une variation de pH dans l'environnement des implants osseux bactérienne. Une étude chez le porc de 3 mois sera mise en place pour évaluer l'efficacité du traitement antibiotique de surface sur les infections à *S. aureus* (souche sensible aux antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine) suite à une intervention. Des ostéotomies partielles (réalisation chirurgicale d'un trou cylindrique au niveau de l'os permettant la pénétration des bactéries) seront réalisées sur des porcs sur plusieurs expérimentations distinctes. Pour la mise au point du modèle infectieux avec ou sans implant et l'étude de la tolérance des implants dans le tissu osseux, il y aura 35 porcs utilisés. Les porcs sont répartis en lots : (i) des lots de porcs ostéomisés, infectés et traités, sans ou avec des clous métalliques nus ou greffés avec des antibiotiques et (ii) lots de porcs témoins ostéomisés, non infectés et non traités. Les suivis post-opératoires consisteront à un examen clinique et comportemental journalier (comportement général, appétit, fièvre, douleur, gonflement et/ou rejet au niveau de l'opération et poids). Des analyses hématologiques seront effectuées afin de suivre les variations des populations sanguines. Afin de mieux visualiser le devenir des biomatériaux et de l'infection, de l'imagerie in vivo (scanner et IRM) sera programmée une fois par semaine sur une période de 21 jours. En fin d'expérience, des prélèvements seront effectués au niveau du site opératoire pour estimer la charge

bactérienne à *S. aureus* et des analyses histo-pathologiques pour voir l'impact du *S. aureus* et de la dispersion des antibiotiques sur les tissus.

Remplacement : L'infection osseuse à *S. aureus* et la pose d'implants, étant difficiles à modéliser in vitro, le modèle animal est indispensable en vue d'une transposition chez l'Homme.

Réduction : Ce projet est une preuve de concept pour déterminer la tolérance de l'os à l'implant et le choix de la dose infectieuse et de la souche de *S. aureus*. La pose d'implants a été randomisée selon un plan d'expériences afin de limiter le nombre d'animaux pour chaque expérience tout en répondant aux questions scientifiques.

Raffinement : les porcs seront sous anesthésie générale durant l'intervention chirurgicale et disposeront d'un traitement permettant de contrôler la douleur; sous supervision vétérinaire et zootechnique pendant 7 jours post-opératoire. Il y aura un enrichissement social (hébergement, groupe/visites animalières) et environnemental (ballon, chaînes). L'utilisation de l'imagerie (CTscan et IRM) permettra de faire le suivi postopératoire de manière non invasive et sans douleur pour l'animal.

8240 Une modification de la température aux jeunes stades peut avoir un effet à long terme sur la croissance, le comportement et la réponse adaptative des poissons avec de probables conséquences sur le bien-être et la productivité en système aquacole. Dans un contexte de développement d'une aquaculture durable, il est indispensable de décrire et de comprendre les effets de la température sur la physiologie et le comportement des poissons. Chez le bar (*Dicentrarchus labrax*), les stades embryonnaires et larvaires semblent être tout particulièrement sensibles à des modifications de la température de l'eau. Cependant, l'amplitude des variations thermales ainsi que les mécanismes sous-jacents sont encore peu connus. Ce projet de recherche vise à mieux comprendre dans quelle mesure et comment la température impacte le bien-être et la productivité du bar dans un contexte d'aquaculture durable.

La réalisation de ce projet consiste à marquer un lot de 2700 bars incubés au stade embryonnaire à 3 températures différentes (900 poissons par lot) et à mesurer leur croissance et leur audace individuelle, et leurs capacités adaptatives face à diverses modifications de leur environnement. Les procédures visent à décrire l'empreinte thermique sur les capacités des poissons à faire face d'un point de vue physiologique et comportementale à un large panel de stress environnementaux. Ceux-ci comprennent : 1. Une modification de la température de l'eau, 2. Un isolement social, 3. Une mise à jeun d'une semaine, 4. Une lésion cutanée, 5. Une succession de stress répétés, et 6. Un stress aigu. Dans le cadre des procédures, du plasma sera prélevé afin de mesurer le cortisol, marqueur de l'état physiologique de l'axe du stress, et des prélèvements d'organes seront effectués afin d'évaluer des paramètres morphométriques, décrire des marqueurs immunitaires, et mesurer l'expression de gènes en lien avec les axes du stress et de la croissance. Au total 2700 bars seront utilisés dans ce projet. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et sont toujours élevés en groupe dans des structures d'élevage adaptées à l'espèce avant et après l'application des procédures (Raffinement). Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions une espèce dans son milieu d'élevage.

8241 Ce projet a comme but principal d'étudier les relations entre empathie et addiction. Il se base sur des recherches cliniques qui mettent en évidence que les personnes souffrant d'une addiction montrent des déficits d'empathie. Grâce aux modèles animaux nous voulons déterminer s'il y a un lien causal entre empathie et addiction, c'est à dire si l'empathie peut accroître le risque de développer une addiction et/ou si la prise de drogue peut induire des déficits d'empathie.

Ce projet se base sur des modèles animaux d'empathie récemment développés qui visent à mettre en évidence le comportement altruiste et pro-social des animaux vis à vis des leurs congénères. Dans un de ces modèles, un rat est emprisonné dans un cylindre et un autre rat a la possibilité d'ouvrir le cylindre et libérer son partenaire sans recevoir aucune récompense. Dans l'autre modèle, dans une

cage opérante, un rat a le choix d'obtenir une récompense (pastilles de sucre) pour lui seul ou de la partager avec un autre rat.

Ainsi, nous voulons mener 2 types d'expérience pour étudier la directionnalité des possibles interactions entre l'empathie et l'addiction. Dans le premier type d'expérience, nous allons mesurer les niveaux basaux d'empathie des rats et ensuite, nous leur donneront la possibilité de s'auto-administrer de la cocaïne. Ainsi, nous déterminerons si les niveaux basaux d'empathie (dans chacun des modèles d'empathie) peuvent prédire le risque de développer une addiction.

Dans le deuxième type d'expérience, nous donnerons à des rats la possibilité de s'auto-administrer de la cocaïne et ensuite, pendant une période d'abstinence, nous allons mesurer les niveaux d'empathie. Ainsi, nous déterminerons si la prise de cocaïne peut induire des changements dans les niveaux d'empathie.

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). Le raffinement a été pris en compte par la réalisation d'une analgésie pré-opératoire suivie d'une anesthésie générale. De plus, les animaux sont hébergés avec du matériel d'enrichissement pour réduire le stress et l'angoisse (raffiner).

Nous avons calculé que pour cette étude 1120 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.

8242 L'ARN messenger est un nouveau type de médicament, qui fait l'objet de 15 essais cliniques. Cette molécule doit pénétrer dans les cellules d'un organe pour induire un effet thérapeutique au cours d'une pathologie humaine. La peau et le cerveau sont deux organes dans lesquels de l'ARN messenger doit être transféré efficacement, afin de soigner diverses affections. On peut citer le mélanome, le psoriasis et la cicatrisation pour la peau ; la schizophrénie et les maladies de Parkinson et d'Alzheimer pour le cerveau. A l'heure actuelle, l'efficacité du transfert d'ARN messenger dans la peau n'est pas suffisante et aucune étude de transfert d'ARN messenger dans le cerveau n'a été publiée. Il est donc nécessaire de mettre au point des procédés efficaces de transfert d'ARN messenger dans ces deux organes, sur un animal suffisamment proche de l'Homme, la souris. Le projet prévoit l'utilisation de 500 animaux. Le nombre d'animaux est réduit au minimum dans la mesure où cela ne compromet pas l'objectif des projets : la mise au point de procédés efficaces de transfert d'ARN messenger dans la peau et le cerveau. Ces derniers seront anesthésiés à l'isoflurane lors des injections et avant leur euthanasie. Les expérimentateurs observeront quotidiennement le comportement général des animaux et leur apparence. Un animal sera euthanasié s'il présente une attitude inhabituelle traduisant un mal-être (prostration, agressivité, etc.) ou l'apparition de toute altération de l'état général (excroissance, prolapsus, etc.).

8243 Selon l'application de l'arrêté du 22 janvier 2014 fixant le cadre national des formations conduisant à la délivrance des diplômes nationaux de licence, un parcours de Physiologie Animale et Neurosciences en Licence « Sciences de la Vie » doit être délivré suite à un enseignement théorique et pratique en lien avec l'étude des grandes fonctions physiologiques chez le mammifère et chez l'homme. De fait, les compétences requises nécessitent un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin d'illustrer les concepts majeurs de la physiologie en conditions concrètes par l'application d'une méthodologie de type recherche scientifique en biologie. Au-delà de l'acquisition de connaissances et de compétences propres à une formation scientifique initiale, les objectifs de ce type de parcours de licence correspondent à la poursuite d'études dans des masters de type biologie-santé impliquant une insertion professionnelle dans des laboratoires de recherche et développement de l'industrie pharmaceutique et des laboratoires de recherche académique qui nécessite des apprentissages en lien avec les problématiques de ces laboratoires. En conséquence,

l'enregistrement de paramètres biologiques et la mise en évidence de régulations nerveuses et hormonales ainsi que d'activités pharmacologiques sur le rat anesthésié semblent primordiaux pour sensibiliser et instruire les étudiants aux pratiques des études précliniques obligatoires dans le développement d'une nouvelle molécule candidat médicament.

Afin d'atteindre ces objectifs de formation méthodologique et pratique, les études sont réalisées sur plusieurs séances réparties sur le second semestre de la troisième année de licence. Les différentes séances permettent aux étudiants, après une étape d'observation des structures anatomiques, d'être initiés aux techniques opératoires et de mise en place de cathéters intraveineux et de canules afin de mesurer l'impact de substances pharmacologiques sur différents paramètres physiologiques (Sécrétion pancréatique et excrétion hydrique). Pour toutes les séances de travaux pratiques, les études sont réalisées sur animaux anesthésiés selon une méthode raffinée assurant l'anesthésie totale et aucun animal n'est réveillé à l'issue de l'expérimentation. Selon le nombre d'étudiants, il est prévu d'utiliser au maximum 100 rats par année universitaire pour ce projet soit un maximum de 500 rats sur 5 ans. Ce nombre est un compromis nécessaire pour répondre aux obligations pédagogiques relatives au diplôme en termes d'observation et de pratique technique et pour satisfaire au critère de réduction du nombre des animaux en vigueur dans la règle des 3R. En effet, au cours de chaque séance, les étudiants se répartissent en binômes ou trinômes afin de réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés. Ce projet visant à répondre aux exigences du Programme Pédagogique National prévoyant des travaux pratiques d'initiation à l'évaluation de l'activité biologique de molécules médicamenteuses sur des modèles *in vivo*, le recours à des modèles animaux est donc incontournable, empêchant le remplacement par des méthodes alternatives.

8244 L'insulinome est une tumeur neuroendocrine pancréatique développée à partir des cellules beta pancréatiques. L'insulinome est caractérisé par la production et la sécrétion inappropriée et non contrôlée d'insuline entraînant des accidents hypoglycémiques potentiellement mortels. Son diagnostic en imagerie médicale peut se révéler difficile car c'est le plus souvent une tumeur de petite taille (90% font moins de 2 cm et 30% moins de 1 cm), ce qui pose des problèmes de détection avec les moyens diagnostiques actuels. L'amélioration progressive des connaissances concernant les caractéristiques biologiques des cellules beta permet de développer des sondes moléculaires diagnostiques hautement sensibles et spécifiques pour l'imagerie nucléaire de l'insulinome. Étant donné que les récepteurs pour le glucagon-like peptide-1 (GLP-1) sont surexprimés dans la plupart des insulinomes, les analogues du GLP-1 radiomarqués apparaissent comme des radiotraceurs diagnostiques potentiels pour l'imagerie nucléaire de l'insulinome. Par conséquent, l'objectif de notre projet est de développer des sondes moléculaires pour le diagnostic topographique d'insulinome en imagerie μ TEP/ μ TDMX (Tomographie par Emission de Positons/ Tomodensitométrie à rayons X) à partir du Dulaglutide (un agoniste du récepteur du GLP-1) radiomarkée avec différents radio-traceurs comme le Cu-64, le Ga-68 et le Zi-89. Ces traceurs seront finalement testés chez le même animal lors d'une étude longitudinale dans un modèle murin d'insulinome chez la souris immunodéficente. Ainsi notre travail intègre une dimension translationnelle dont les résultats pourront directement influencer les pratiques cliniques actuelles concernant l'exploration fonctionnelle des insulinomes. Le modèle qui sera utilisé dans notre étude sera obtenu en injectant à la souris une suspension de cellules RIN-5F (cellules beta d'îlots de Langherans de rat) en sous cutanés. Le suivi de la croissance tumorale sera effectué en imagerie μ TEP/ μ TDMX à l'aide du Dulaglutide marqué avec ces 3 radiotraceurs. En fin de protocole, les tumeurs seront prélevées post mortem pour des études métabolomiques par Résonance Magnétique Nucléaire.

Le nombre d'animaux prévus pour cette étude est de 80.

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

- Réduire : Nous n'utiliserons que 20 animaux par groupe, 20 étant le minimum pour pouvoir faire des études statistiques dans ce type d'étude qui présente une grande variabilité interindividuelle. Nous utiliserons le test statistique Mann Whitney adéquat pour les petits effectifs.

- Raffiner : Nous allons enrichir l'environnement des animaux et un suivi quotidien des animaux est effectué afin de mettre en évidence des signes précoces de souffrance (grille d'observation). Les animaux porteurs de tumeurs seront euthanasiés avant d'atteindre le point limite. Pendant les séances d'imagerie les animaux sont anesthésiés et chauffés.

- Remplacer : Des tests in vitro préalables ont été réalisés mais l'objectif de ce travail étant de montrer les effets potentialisant de l'irradiation proton sur la croissance tumorale, elle ne peut se faire que sur des animaux.

8245 Dans la sphère cranio-faciale, les causes de pertes de substances osseuses peuvent être d'origine malformatives, traumatiques ou secondaires aux exérèses tumorales. Plusieurs procédés permettent de les restituer selon la taille du déficit : les greffes osseuses, les biomatériaux phosphocalciques ou encore les transplants micro-anastomosés. Les greffons autologues et les substituts osseux peuvent être utilisés de manière isolée ou combinée dans les terrains les plus favorables (défaut osseux limité, richesse médullaire environnante, éloignement des zones contaminées). Dans les défauts osseux maxillo-mandibulaires étendus, souvent situés en zone contaminée ou cicatricielle, seuls les transplants osseux microanastomosés sont indiqués, au prix de procédés chirurgicaux lourds et d'une morbidité accrue. L'étude chez l'animal a montré que l'association de biomatériaux phosphocalciques de type « Biphasique Calcium Phosphate » (BCP) ou d'un autre biomatériau phosphocalcique (CaP) à de la moelle osseuse totale (MOT) permettait d'obtenir une néoformation osseuse mais sans pouvoir égaler les techniques de greffe osseuse autologue. Nos travaux précédents, ont d'ailleurs montré l'intérêt d'associer une autogreffe de moelle osseuse totale (MOT) ou des cellules souches mésenchymateuses différenciées (SCM) à des BCP pour favoriser la repousse osseuse dans ce territoire à faible trophicité. Les résultats obtenus par ces associations étaient proches bien qu'inférieurs à ceux obtenus par la technique de référence (greffe autologue) responsable de morbidités et permettant la reconstruction de volumes limités. La réparation osseuse peut être compromise du fait de l'altération de l'environnement de la zone à régénérer (hypoplasie tissulaire, cicatrices), et/ou du fait du volume du greffon, qui n'est que lentement revascularisé et de manière centripète. L'utilisation de facteurs moléculaires (adjuvants) améliorant la régénération osseuse en terrain défavorable est une voie de recherche prometteuse pour pouvoir limiter le prélèvement osseux autologues ou l'utilisation de procédés chirurgicaux lourds pour les patients. L'association d'adjuvants aux biomatériaux peut ainsi avoir un rôle majeur dans l'amélioration des procédés d'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) en vue de se substituer aux prélèvements autologues chez le patient.

L'objectif de ce travail est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux phosphocalciques permettant une meilleure revascularisation et l'apport des adjuvants dans la régénération osseuse in vivo dans des modèles pré cliniques de défauts de calvaria (voûte crânienne) chez le rat Lewis. Les adjuvants étudiés en ITO pour l'amélioration de la néoformation osseuse seront un transporteur en dioxygène (TO₂), en vue d'améliorer la diffusion de l'O₂ au sein du biomatériau, la MOT comme apport de cellules souches, le patch riche en fibrine (PRF) permettant l'apport de facteurs de croissance cellulaire. Les 2 nouvelles classes de biomatériaux phosphocalciques (CaP) seront : l'hydroxyapatite carbonatée (CHA) et le pyrophosphate (PP).

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer l'intérêt de nouveaux biomatériaux et l'association de TO₂, de MOT ou de PRF pour la régénération osseuse des défauts de calvaria (voûte crânienne). Cette étude a donc pour but de montrer qu'il est possible d'améliorer un procédé d'ITO peropératoire afin d'éviter les techniques de greffe osseuse nécessitant un prélèvement osseux contraignant pour les patients en diminuant la morbidité de cette procédure. Cette étude se déroulera sur 5 ans. 141 rats seront nécessaires. Le remplacement de l'animal n'étant pas possible pour cette expérimentation in vivo, le nombre d'animaux sera divisé par 2. Afin de réduire de moitié le nombre de rats, 2 défauts de calvaria seront réalisés par animal. La réalisation de ces 2 défauts a montré une très bonne tolérance dans les expérimentations précédentes réalisées au sein du laboratoire. Nous raffinerons les conditions d'hébergement des animaux par un enrichissement des milieux dans chaque cage. Les animaux seront observés de manière quotidienne par les animaliers de l'unité expérimentale pour s'assurer du bien être des animaux. Une analgésie sera donnée de façon systématique en per et post-opératoire ainsi qu'en cas de détection de signe de souffrance même mineure.

8246 La maladie d'Alzheimer (MA) est une pathologie humaine neurodégénérative qui à l'heure actuelle reste incurable. Elle entraîne des troubles de l'apprentissage et de la mémoire, mais affecte également d'autres fonctions telles que le langage, la reconnaissance des éléments de l'environnement et les fonctions motrices.

Au niveau du tissu cérébral des patients, cette maladie est caractérisée par une sévère atrophie du cortex cérébral, d'importants signes de stress oxydatif, et par la présence de 2 marqueurs capitaux : les agrégats de peptides β -amyloïde et les dégénérescences neurofibrillaires.

Cette pathologie existe sous deux formes, la forme génétique, la moins répandue (< 5%) et la forme sporadique qui touche la grande majorité des patients (> 95%). La forme génétique est très étudiée notamment par l'intermédiaire d'animaux transgéniques, tandis que la forme sporadique reste chez le rongeur encore mal modélisée, certainement en raison de la difficulté à établir l'origine de cette pathologie.

Néanmoins la mise au point de nouveaux modèles animaux mimant la MA est cruciale pour le développement de nouveaux médicaments ciblant cette pathologie. En effet les développements passés, basés principalement sur des modèles transgéniques ou des modèles utilisant la toxicité du peptide β -amyloïde, ont permis, fin des années 1990, de mettre sur le marché 4 traitements symptomatologiques, qui sont aujourd'hui considérés par la Haute Autorité de Santé comme ayant un faible intérêt thérapeutique. A l'heure actuelle, de nombreuses molécules engagées en phase clinique échouent parce que les modèles animaux utilisés pour leur développement n'ont pas été suffisamment prédictifs de l'efficacité des molécules chez l'Homme. La mise au point de nouveaux modèles reste une étape indispensable pour tester l'efficacité de nouveaux traitements pour la MA.

L'un des points clés pour ce développement est l'identification de l'origine de la MA. En se basant sur de nombreux résultats obtenus par des études cliniques, une hypothèse a été formulée : la MA trouverait son origine dans un dysfonctionnement de la régulation de la voie de signalisation de l'insuline. En effet des études épidémiologiques ont permis de corrélérer la résistance à l'insuline (diabète de type II) avec l'émergence de la MA. D'autres études ont montré qu'un fragment du peptide β -amyloïde était capable de réduire la signalisation de l'insuline.

Une telle résistance peut être induite par certains agents chimiques injectés directement dans le cerveau mais présentent l'inconvénient majeur d'induire une forte inflammation du tissu cérébral et des lésions qui ne sont pas en lien avec la résistance à l'insuline. Notre projet a pour objectif de trouver un modèle alternatif et d'induire une résistance cérébrale à l'insuline sans toxicité pour le tissu cérébral. Ainsi nous souhaitons utiliser le produit X, non-toxique, connu pour induire une résistance à l'insuline, afin de développer un nouveau modèle de MA. L'administration du produit X sera effectuée par voie intra nasale. Pour évaluer les effets du produit X, les animaux réaliseront des tests comportementaux mesurant leurs performances de mémoire dans plusieurs tests complémentaires : le test de la piscine de Morris (mémoire spatiale à long terme), le test du labyrinthe en Y (mémoire spatiale à moyen terme), le test de reconnaissance d'objet (mémoire à court et moyen terme), et le test de coordination sensorimotrice.

Au maximum 579 souris mâles C57BL6J âgées de 7 semaines seront utilisées dans ce projet, sur 3 ans. Un lot de 135 souris maximum sera nécessaire pour la validation des tests comportementaux. Un autre lot de 60 souris maximum sera utilisé pour la mise au point de la formulation, des doses et de la fréquence d'administration du produit X. Enfin 384 souris maximum seront utilisées pour évaluer les effets comportementaux et histo-pathologiques d'une administration chronique du produit X.

Les animaux seront hébergés à 3 par cage (18.9 x 29.6 x 12.8 cm) pour l'ensemble des groupes expérimentaux, en cycle de lumière inversé pour observer leur comportement suite aux traitements effectués pendant leur phase active et ainsi respecter leur horloge biologique (chronobiologie), et des fibres de coton seront placées dans leur cage comme enrichissement pour assurer leur bien-être (Raffinement).

Les animaux seront observés quotidiennement tout au long de l'expérimentation et en cas d'atteinte d'un des points limites fixés (perte de poids, agressivité, cachexie, vocalises, etc.), ils seront euthanasiés dans des conditions éthiques.

Dans notre projet nous avons veillé à pouvoir réutiliser au maximum les animaux si cela était possible afin de réduire le nombre d'animaux nécessaire (réduction). La méthode d'administration du produit X se substitue à plusieurs interventions chirurgicales, ce qui permet d'améliorer les conditions de bien-être des animaux (raffinement). La modélisation de la maladie d'Alzheimer à ce niveau complexe d'intégration ne peut à l'heure actuelle être modéliser in vitro ou in silico (remplacement).

8247 Les gliomes sont les tumeurs cérébrales les plus fréquentes chez l'Homme. La forme la plus agressive est le glioblastome multiforme qui touche 2400 personnes par an en France, avec une survie moyenne de 12 à 15 mois. Les traitements actuels qui associent la chirurgie et la radio/chimiothérapie, restent malheureusement non curatifs et l'issue est fatale. L'inconvénient majeur des traitements actuels est le manque de spécificité pour les cellules tumorales par rapport au tissu sain, d'où l'importance de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques visant à cibler spécifiquement les cellules tumorales.

Le protocole utilisera des nanobodies reconnaissant les cellules de glioblastomes humains et murins. Ces petits fragments (13 kDa) correspondent aux domaines variables des chaînes lourdes de certains anticorps de lamas et sont caractérisés par d'étonnantes propriétés en termes de production, de stabilité et de reconnaissance d'épitopes enfouis, inaccessibles aux anticorps conventionnels. Les études *in vitro* montrent que deux de ces nanobodies provoquent une inhibition de la prolifération cellulaire et la mort des cellules de glioblastome de rat F98, sans altérer les cellules saines.

Les études *in vivo* consisteront à tester ces nanobodies fluorescents (marqués par FITC) chez des rats Fisher porteurs de gliomes F98 afin d'évaluer le développement tumoral et le ciblage de la tumeur par les nanobodies. Si l'injection intra-tumorale montre son efficacité, une telle administration locale des nanobodies serait efficace juste après le retrait chirurgical de la tumeur. Or, il est admis que la BHE est altérée par la présence d'une tumeur de glioblastome car des produits contrastants peuvent localiser la tumeur. Il sera donc important de savoir si les nanobodies peuvent franchir la BHE pour un éventuel traitement par injection intraveineuse (IV) en particulier pour les tumeurs inaccessibles par neurochirurgie, ou comme traitement préopératoire. Ce protocole s'organise en 5 études dépendantes les unes des autres.

1-L'étude 1, déterminera l'effet direct des nanobodies après leur injection intra-tumorale (30, 50 et 100 ug) chez des rats Fisher femelles adultes porteurs de glioblastome. 3 groupes de 6 rats porteurs d'une tumeur de glioblastome F98 seront traités avec les nanobodies, un groupe contrôle aura une injection intra-tumorale de milieu PBS, et un autre groupe contrôle aura une injection intra-tumorale de nanobodies n'ayant aucun effet *in vitro* sur les cellules de glioblastomes. Il est évident que si les nanobodies n'ont pas d'effet direct sur la tumeur, la suite du protocole sera arrêtée.

2-L'étude 2 déterminera la dose de nanobodies efficace pour traverser la BHE et cibler la tumeur. 3 groupes de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de gliomes seront traités avec 3 doses croissantes de nanobodies par injection intraveineuse. Un groupe supplémentaire de 6 rats non porteurs de tumeur recevra une administration de la dose la plus élevée de nanobodies pour évaluer le passage ou non de nanobodies en l'absence de tumeur.

3-Selon les résultats de l'étude 2, la 3ème étude évaluera le temps optimal du passage de la BHE par les nanobodies après leur injection chez des rats Fisher femelles adultes porteurs de glioblastome. 5 groupes de 6 rats seront traités avec la meilleure dose de nanobodies (étude 2) par injection intraveineuse, et les animaux seront euthanasiés à différents temps (1h, 6h, 12h, 24h et 48h).

4-Selon les résultats précédents, l'étude 4 déterminera à quel moment la BHE est la plus perméable aux nanobodies. L'étude consistera à traiter 3 groupes de 6 rats Fisher femelles adultes porteurs de glioblastome avec la dose optimale de nanobodies (étude 2) injectée 7, 14 ou 28 jours après l'implantation de la tumeur. Les animaux seront euthanasiés au temps optimal après l'injection de nanobodies (étude 3).

5-Enfin, selon les résultats des études précédentes, un dernier groupe de 6 animaux recevront aussi une implantation de glioblastome au jour J0 comme décrit précédemment, puis à partir du moment optimal où la BHE est perméable (étude 4), ils recevront une injection quotidienne sur 5 jours de la dose optimale de nanobodies (étude 2), puis seront disséqués au moment optimal (étude 3) et analysés pour la présence de nanobodies et pour le volume tumoral par rapport à un groupe de 6 animaux qui auront reçu l'implantation de cellules tumorales mais sans traitement avec les nanobodies.

Le nombre d'animaux nécessaire à ce protocole (250 animaux pour tester 2 nanobodies ayant déjà montré leur efficacité *in vitro* sur des cellules de glioblastome, et 2 nanobodies contrôles n'ayant aucun effet) a été estimé en fonction des protocoles précédemment réalisés par le laboratoire (pour des résultats statistiquement exploitables) en tenant compte des risques inhérents au protocole

(anesthésie et atteinte potentielle de point limite). L'implantation de la tumeur par stéréotaxie sera réalisée sous anesthésie et analgésie et un suivi quotidien des animaux sera réalisé.

Ces travaux respectent au mieux la règle des 3R, selon la directive européenne n°2010/63/UE, en remplaçant ou à défaut, en réduisant le nombre d'animaux utilisés. En effet, selon l'étude 1, si l'administration directe des nanobodies ne montre pas d'effet sur la tumeur, nous arrêterons toute l'étude (réduction). De plus, selon les résultats obtenus pour la cinétique de ciblage des nanobodies in vivo, tous les temps ne seront pas nécessairement étudiés (réduction). Nous suivons une grille d'évaluation au cas où un animal montrerait une douleur spéciale, et nous arrêterons l'expérience pour cet animal (raffinement). Enfin, nous mettons tout en œuvre pour réduire toute forme de douleur, de souffrance ou de stress de l'animal, en utilisant des méthodes anesthésie/analgésique appropriées à la technique de chirurgie utilisée, en suivant l'état général des rats pendant l'expérimentation (poils hérissés, pincement de la patte ou de la queue pour évaluer la douleur,..), et en hébergeant les rats en nombre raisonné dans les cages, avec enrichissement des cages (p. ex. présence d'une cabane).

8248 Les faisceaux d'ions qui seront utilisés dans ce protocole d'étude possèdent des propriétés physiques et biologiques qui leur confèrent des avantages significatifs par rapport aux rayons conventionnels (rayons X) utilisés en clinique.

Contrairement à ces rayons conventionnels dont le profil de dose délivrée aux tissus diminue progressivement avec la profondeur traversée, celui des ions est caractérisé par un dépôt de dose élevé en fin de parcours, alors que la dose déposée en amont, est beaucoup plus faible. Ainsi, la dose d'irradiation reçue par le patient et la morbidité sont moindres avec cette approche thérapeutique. Cette technologie permet aussi de déposer le maximum d'énergie au sein d'un volume cible circonscrit (la tumeur), tout en épargnant les tissus sains en amont et en aval. Grâce à ces propriétés, alliées à une faible diffusion latérale, la dose déposée dans les tissus peut être strictement confinée au volume cible avec une précision nettement plus grande qu'en radiothérapie conventionnelle.

Notre étude consiste à étudier, dans un modèle tumoral induit par injection en sous cutanée de cellules cancéreuses chez la souris NMRI immunodéficiente, les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur en imagerie.

L'irradiation sera faite sur des tumeurs de 5 mm de diamètre. Le protocole d'irradiation sera mis au point de manière à protéger les souris au maximum et les irradiations seront administrées de manière ciblées (protocoles d'anesthésie, dose de rayonnement ciblée, dosimétrie). Les effets biologiques induits par l'irradiation seront évalués par une étude longitudinale en imagerie TEP de 17 à 21 jours au cours de laquelle la souris recevra 5 doses d'un des 3 traceurs radiomarqués sélectionnés. Ces marqueurs ciblent le métabolisme cellulaire ([18F]-FDG), la prolifération cellulaire ([18F]-FLT) et l'apoptose ([18F]-ML10). Afin d'obtenir des données significatives du point de vue statistique, nous utiliserons des lots de 7 souris par condition, ce qui amènerait le nombre total d'animaux à 142. Un 4ème marqueur ciblant l'annexine sera utilisé selon le même protocole en imagerie μ TEMP (28 souris). Au total, en incluant les souris de l'étude histologique et les animaux prévus pour les études de courbe de croissance tumorale et de biodistribution des traceurs, le nombre total d'animaux de cette étude est de 336.

La règle des 3 R sera appliquée car l'utilisation de l'imagerie permet de suivre l'évolution de paramètres biologiques sur le même animal sur plusieurs jours, réduisant ainsi le nombre d'animaux. La douleur et la souffrance seront pris en compte par un suivi quotidien des animaux avec une grille de notation de la douleur et de la croissance tumorale qui déterminera les points limites (20% de perte de poids et volume tumoral de 200mm³ par exemple) nécessitant une éventuelle euthanasie de la souris. En cas de douleur, des analgésiques seront utilisés pour y remédier. Cette étude ayant pour objectif de suivre les effets biologiques d'une irradiation proton sur la tumeur, celle-ci ne peut s'appliquer sur une étude in vitro car nous n'aurions pas l'implication du tissu environnant (vascularisation) sur les effets de cette irradiation.

8249 Dans le cadre de la recherche et développement de médicaments vétérinaires, l'innocuité et la tolérance des candidats médicaments doivent être évaluées pour déterminer la sécurité d'utilisation du produit chez l'espèce cible.

L'objectif du projet (ou protocole cadre) est de définir les conditions de réalisation des études de tolérance chez l'animal de rente dans le respect du bien-être animal et de la règle des 3Rs, pour pouvoir établir le profil de tolérance du produit en développement. Plusieurs études de tolérance pourront être requises pour établir le profil tolérance du produit et définir une dose, selon l'état d'avancement du développement du produit.

L'espèce cible du présent projet est l'animal de rente (bovin, porcin, ovin, caprin), jeune ou adulte. Le projet inclura plusieurs études de tolérance, en administration unique ou répétée. Le nombre d'animaux inclus dans chaque étude sera déterminé selon la nature du produit testé, le stade d'avancement du développement du produit et la finalité de l'étude (exemples : étude pilote, réglementaire), le nombre de voie d'administration à tester, et dans le respect des textes réglementaires correspondants en vigueur. Le nombre total d'animaux sur la durée de vie du projet n'excèdera pas 800 animaux par espèce (32 animaux/étude x 5 études/an x 5 ans par espèce).

Le projet est conçu pour être répété en totalité ou partiellement. Il vise à caractériser la tolérance de nouveaux produits chez l'animal de rente, sans compromettre l'atteinte de l'objectif et dans le respect du bien-être animal et des principes de remplacement, de réduction et de raffinement, et d'indicateurs précoces, dans une expérimentation animale, de toute souffrance ; ces derniers sont définis selon une grille d'évaluation élaborée (et régulièrement revue) conjointement par la structure chargée du bien-être animal, le comité d'éthique et les expérimentateurs.

- les études réglementaires sont réalisées séquentiellement afin d'obtenir toutes les informations scientifiques nécessaires tout en minimisant le nombre d'animaux utilisés et en préservant leur bien-être,
- tous les traitements, prélèvements et euthanasies seront réalisés conformément aux procédures en vigueur au sein de l'EU,
- depuis leur inclusion et jusqu'au dernier jour de l'étude, les animaux seront suivis quotidiennement et si requis, les animaux seront soignés et sortis de l'étude ou euthanasiés pour leur éviter toute souffrance ; les conditions d'hébergement permettent aux animaux de répondre à leurs besoins physiologiques,
- les points limites sont tout changement du comportement ou de l'aspect de l'animal, dont perte d'appétit, perte de poids, altération de la respiration, excrétion anormale, dans les jours suivant le(s) traitement(s) ; toute observation laissant présager un début de mal-être, est immédiatement signalée au vétérinaire qui viendra ausculter l'animal et prendra les décisions adéquates pour protéger l'animal.

Ce projet couvre également

- le recueil de tissus ou de matrices dans le but de préparer des matrices biologiques témoins requises pour les activités de bioanalyse
- l'acquisition et le maintien des compétences techniques par le personnel assurant l'application des procédures expérimentales aux animaux, le développement de techniques et/ou méthodes, et/ou la génération de données historiques.

8250 Le but de ce projet est de former, entraîner et/ou ré-entraîner les utilisateurs à la réalisation/maîtrise de techniques d'administration et de prélèvement.

Cette formation/réentraînement s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures expérimentales, détenteurs d'un niveau concepteur ou réalisateur en expérimentation animale et souhaitant être encadrés pour la réalisation de certains gestes techniques afin d'apprendre à travailler en totale autonomie et en aisance technique.

Les gestes expérimentaux seront : administration d'un composé en voie SC (sous-cutanée), en IM (intramusculaire) en ID (intra-dermale), en IP (intra-péritonéale), en IV (intraveineuse (veine de la queue, sinus rétro-orbitale)). Administration d'un composé par voie orale (gavage), administration d'un composé par voie intra-tibiale.

Effectuer des prélèvements sanguins, des prélèvements d'urine, des prélèvements de LCR (liquide céphalo rachidien), des prélèvements de bile.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque utilisateur. Pendant toute la période précédant la mise en œuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages destinés à l'euthanasie et les procédures seront sans réveil et dans lesquelles les animaux seront anesthésiés (générale + locale), analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffants. Cependant, les administrations d'un composé par voie IV (veine de la queue) et par voie orale (gavage) pourront être pratiquées sur animaux vigiles et dans le cadre d'une procédure classée légère.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux de réforme issus des élevages. Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 300 souris et 200 rats maximum. L'objectif de ce projet est de maîtriser un certain nombre de techniques d'administration/prélèvements. L'utilisation d'animaux est donc incontournable.

8251 Le foie est un organe central dans la régulation du métabolisme des sucres et des graisses. Lors d'un repas, le foie va stocker les sucres sous forme d'une molécule complexe appelée glycogène. Entre deux repas ou lors d'un jeûne, la glycémie (taux de sucre dans le sang), sera maintenue à une valeur proche de 1 g/L grâce à une production de glucose, par dégradation des stocks de glycogène du foie. Dans le cas d'une surcharge alimentaire entraînant l'obésité et/ou le diabète de type 2, le foie est aussi capable de stocker le sucre sous forme de graisses, entraînant le développement d'un foie gras (stéatose).

En réponse à un déséquilibre de stockage des réserves (foie gras), le foie va produire des hormones capables de réguler la dépense énergétique de l'organisme et ayant des effets spécifiques au niveau des muscles et/ou du tissu adipeux. Par exemple, ces hormones sont capables de moduler la sensibilité à l'insuline et ainsi de jouer sur l'entrée et l'utilisation des sucres par le muscle et le tissu adipeux.

Dans ce projet, nous chercherons à établir les liens moléculaires qui permettent de contrôler l'équilibre glycémique et énergétique, afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques utiles dans le cadre de l'obésité et/ou du diabète de type 2. En modifiant le métabolisme du foie, nous induirons par transgénèse l'accumulation de graisses au niveau du foie chez la souris. Nous étudierons ensuite le rôle d'un facteur clé du métabolisme glucidique, en inhibant son expression spécifiquement dans le foie. Nous caractériserons le métabolisme du foie, des muscles et du tissu adipeux, en absence et présence de ce facteur. La sensibilité à l'insuline sera analysée, comme chez l'homme, par un suivi de la glycémie au cours du temps après injection de glucose ou d'insuline. La dépense énergétique des souris sera mesurée par calorimétrie indirecte en mesurant leur consommation d'oxygène et leur production de CO₂. Leur composition corporelle sera déterminée en mesurant chez l'animal vivant le pourcentage de graisse et de masse maigre. Les analyses moléculaires seront réalisées sur les tissus prélevés en fin de protocole après euthanasie des animaux.

Cette étude sera réalisée dans le respect de la règle des 3R :

-Remplacement : La régulation de la glycémie et de la dépense énergétique fait intervenir un dialogue inter-organes, comprenant le foie, le cerveau, le tissu adipeux, les muscles, le pancréas... Notre étude nécessite donc de travailler sur l'organisme en entier pour conserver ces communications inter-organes. Elle sera donc réalisée chez la souris grâce à une approche de transgénèse qui permet de cibler des modifications du métabolisme uniquement dans le foie. Un prélèvement de ces différents organes nous permettra de faire l'étude moléculaire.

-Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur le modèle animal développant une stéatose hépatique. Les souris femelles transgéniques non utilisées dans ce projet seront utilisées pour la reproduction ou incluses dans un autre projet. Le nombre d'animaux a été fixé à 12-14 animaux par groupe pour effectuer des analyses statistiques. Au total, ce projet nécessitera au maximum 224 souris sur une période de 4 ans.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation, avec accès libre à la nourriture et l'eau de boisson. Ils seront manipulés et pesés régulièrement avec une observation quotidienne de leur état général. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. La modification du

métabolisme se traduit par l'apparition d'un foie gras, sans conséquence sur le bien-être animal. L'utilisation d'analgésiques locaux permettra de limiter la douleur lors des prélèvements sanguins. Les temps d'analyse des souris nécessitant l'isolement de l'animal seront réduits au maximum et les animaux retrouveront leur groupe immédiatement après l'étude de la dépense énergétique. Les souris seront euthanasiées à la fin du protocole selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les tissus à analyser.

En conclusion, ce projet permettra de caractériser les mécanismes de régulation du métabolisme des sucres et des graisses pour identifier de nouvelles cibles thérapeutiques dans le cadre de l'obésité et du diabète de type 2.

8252 L'épilepsie est un trouble neurologique majeur qui touche 65 millions de personnes dans le monde et 30% des patients épileptiques souffrent de crises résistantes aux médicaments. En particulier, l'épilepsie mésiotemporale (MTLE) est la forme la plus courante des épilepsies réfractaires et se caractérise par des crises spontanées. Cette épilepsie est initiée par un traumatisme initial survenant dans la petite enfance, qui est suivi d'une période de latence de plusieurs années avant l'apparition des crises. Cette période de latence correspond au développement progressif de l'épilepsie, un processus appelé épileptogénèse. La pharmacorésistance de cette pathologie crée un réel besoin de trouver de nouvelles thérapies visant à prévenir l'épileptogénèse et/ou supprimer les crises durant la phase chronique de la maladie. Des études sur des pièces de résection chirurgicale provenant de patients souffrants de MTLE ont révélé une perte d'interneurones GABAergiques et une réduction de la transmission synaptique inhibitrice. Cette perte de neurones GABAergiques participe à l'augmentation de l'excitabilité neuronale responsable des crises. Aussi, l'objectif de ce projet est de réintroduire au sein des réseaux épileptiques de nouveaux neurones GABAergiques, générés par reprogrammation cellulaire des cellules gliales en nouveaux neurones, pour restaurer la transmission inhibitrice perdue et bloquer/réduire les crises.

La compréhension des mécanismes sous-jacents de la MTLE et le développement de nouvelles thérapies nécessitent l'utilisation de modèles animaux présentant des crises spontanées chroniques. Il n'existe à ce jour aucun modèle cellulaire permettant de reproduire l'épilepsie in vitro. Nous avons développé et utilisé avec succès au cours des 15 dernières années un modèle chronique de MTLE obtenu chez la souris adulte par une micro-injection intracérébrale de kainate (analogue du glutamate induisant une excitotoxicité) dans l'hippocampe. Ce modèle constitue le modèle animal le plus adapté car il mime la plupart des caractéristiques histo-pathologiques, électrophysiologiques, comportementales et pharmacologiques de la MTLE humaine. Ce modèle animal a été validé précédemment dans de nombreuses autorisations de projet en expérimentation animale.

Dans ce projet de recherche fondamentale et translationnelle, nous utiliserons ce modèle d'épilepsie focale chez la souris pour étudier le potentiel de la reprogrammation cellulaire comme nouvelle approche thérapeutique de l'épilepsie. Il est important de rappeler que la MTLE ne s'accompagne pas de douleur particulière chez l'homme ou les souris. Les animaux recevront des injections intracérébrales de facteurs déterminants pour induire cette reprogrammation. Ces procédures pouvant s'accompagner d'une douleur/angoisse modérée, tous les efforts seront entrepris pour réduire au minimum toute douleur/souffrance/angoisse ressentie par les animaux. C'est pourquoi nous surveillerons l'état de santé des animaux tout au long des expériences afin de pouvoir intervenir de manière appropriée dès le moindre signe de douleur/angoisse. A la fin du projet, tous les animaux seront euthanasiés pour permettre l'analyse histologique de leur cerveau. De plus, le nombre d'animaux nécessaire à cette étude (864 sur une durée de 5 ans) a été réduit au minimum sur la base des besoins imposés par les tests statistiques que nous utiliserons pour garantir la validité statistique des expériences.

Notre projet devrait montrer que les neurones GABAergiques reprogrammés restaurent l'inhibition GABAergique perdue dans l'épilepsie, et permettent de réduire/stopper les crises ouvrant de nouvelles perspectives pour traiter les patients atteints de MTLE.

8253 Les immunothérapies actuelles sont en plein essor dans le cadre du traitement contre le cancer. Cependant, malgré un effet démontré sur la régression tumorale et l'augmentation de la survie globale, ces thérapies ne sont effectives que dans 20 % à 40 % des patients. Une des hypothèses

actuelles pour expliquer la différence de réponse entre patients est la présence ou non d'une réponse immunitaire active préexistante au traitement. Un des domaines actifs de recherche est ainsi lié à la mise au point de modalités de traitements complémentaires qui pourraient soit pré-activer une réponse immunitaire anti-tumorale avant une immunothérapie, soit amplifier cette réponse suite ou en parallèle d'une immunothérapie.

L'objectif de notre étude est de caractériser le potentiel des ultrasons focalisés à remplir le rôle de traitement complémentaire pour améliorer la réponse aux immunothérapies.

Les ultrasons thérapeutiques sont aujourd'hui utilisés en clinique pour le traitement du cancer de la prostate et sont à l'étude comme traitement prometteur de nombreuses autres tumeurs solides. Ils présentent l'avantage d'être non invasifs et bien tolérés. Ils ne peuvent cependant pas être utilisés pour traiter de manière systémique, et particulièrement les métastases à distance, première cause de mortalité après un traitement HIFU. Ces traitements par ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) reposent sur une focalisation d'un faisceau d'ondes ultrasonores pour concentrer l'énergie acoustique dans une zone, dont la taille typique est similaire à celle d'un grain de riz. Dans cette région très localisée, il est possible d'induire des effets thermique ou mécanique afin de détruire les cellules tumorales.

Des travaux récents ont montré que les HIFU pourraient avoir une action locale et systémique sur la réponse immunitaire anti-tumorale, ouvrant la voie à de nouvelles modalités de traitement.

L'hypothèse de travail de cette étude est qu'il est possible d'induire une stimulation de la réponse immunitaire anti-tumorale par un traitement ultrasonore et que cette stimulation pourrait se traduire par une action systémique et potentialiser les immunothérapies.

L'objectif de cette étude est donc de caractériser la réponse immunitaire et l'efficacité clinique induite par un traitement ultrasonore focalisé combiné à un traitement d'immunothérapie afin de quantifier l'effet synergique potentiel de cette combinaison. Un traitement ultrasonore focalisé mécanique sera combiné avec un anticorps anti-PD1, une des immunothérapies les plus étudiées actuellement. Une recherche du timing optimal menant à un effet maximal au niveau de la réponse immunitaire intra tumorale et de la réponse clinique sera effectuée. Cette étude sera réalisée sur un modèle murin syngénique non orthotopique d'adénocarcinome de côlon, le modèle MC38.

La démarche 3R (Remplacement, réduction, raffinement) est appliquée : le nombre d'animaux sera réduit au minimum, avec un nombre total de 480 souris pour 24 lots. L'étude de la réponse immunitaire est rendue impossible in vitro de par la complexité des interactions des cellules de l'immunité avec l'environnement tumoral. L'analyse de la réponse immunitaire anti-tumorale face à un traitement ne peut être remplacée par d'autres méthodes alternatives. Une définition précise des points limites est donnée, et seront surveillés régulièrement, contribuant au bien-être animal. L'environnement et l'habitat dans lequel évolueront les souris seront optimisés (nombre de souris par cage, ajout de coton, etc.) et toutes les précautions nécessaires seront prises afin que nos animaux soient le moins stressés possibles. Les paramètres ultrasonores appliqués auront été préalablement sélectionnés par simulations numériques et tirs sur tissus ex vivo.

8254 Les infections du tractus respiratoire, chez l'Homme, sont les plus fréquentes parmi les pathologies aiguës dans le monde, et constituent la première cause de mortalité chez les nourrissons et les jeunes enfants (environ 2 millions de décès/an). Parmi les agents étiologiques responsables de ces infections, le métapneumovirus humain (hMPV) et le virus respiratoire syncytial humain (VRS) ont un impact majeur, responsables d'environ 30% des hospitalisations pour infections des voies respiratoires dans cette population.

Le présent projet vise à développer des préparations vaccinales et/ou des traitements antiviraux innovants contre ces deux virus, pour lesquels il n'existe aujourd'hui aucune option efficace disponible sur le marché. Malgré le progrès des dernières années dans les modèles in vitro de culture cellulaire, il n'est pas possible d'obtenir des informations suffisantes sur l'efficacité et la sécurité d'un vaccin ou d'un traitement antiviral sans faire appel à un modèle animal qui mime la maladie provoquée par ces virus ainsi que la réponse immune associée. De plus, pour la mise sur le marché d'un médicament immunologique, les lignes directrices européennes édictées par l'European Medicines Agency imposent le recours aux modèles animaux. Dans ce sens, les études in vitro ont permis de développer

puis de sélectionner uniquement les candidats les plus prometteurs pour évaluer leur innocuité et leur efficacité chez la souris, le modèle expérimental de choix pour ce type d'infections.

Concernant la procédure expérimentale, le nombre d'animaux utilisés pour le développement de chaque produit sera optimisé, pour réduire au minimum ce nombre. On estime utiliser un maximum de 216 souris/an, soit un maximum de 1080 souris pour la durée totale du projet. Ce nombre sera révisé à la baisse si une molécule innovante ou un vaccin efficace sont découverts avant les 5 ans de la durée du projet. Les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à leurs besoins, en groupes sociaux, avec des moyens de nicher et de se cacher dans leurs cages. Les animaux seront manipulés par du personnel formé à la manipulation de ces espèces. De plus, les signes cliniques que l'infection par ces virus provoque chez les animaux sont bien connus. Ils peuvent être anticipés et les manifestations les plus importantes seront traitées pour limiter la souffrance des animaux. Finalement, et toujours sous la supervision d'un vétérinaire spécialisé, chaque expérience avec un nouveau candidat vaccin ou antiviral fera l'objet d'une étude rétrospective avant de lancer un nouvel essai, afin de tirer les leçons de l'étude précédente pour améliorer si possible le programme de soins.

8255 La réponse inflammatoire est généralement bénéfique pour l'organisme car elle le protège efficacement contre les infections et permet la réparation des tissus lésés suite à une blessure. Cependant lorsque l'inflammation est chronique ou excessive, elle devient délétère causant des syndromes auto-inflammatoires pouvant aller jusqu'à la mort du patient. L'inflammation est donc très finement contrôlée. Un nombre croissant d'études souligne le rôle de l'inflammation chronique dans la progression de pathologies aussi répandues que le diabète de type 2, la maladie de la goutte, la maladie de Alzheimer, l'athérosclérose ou le cancer. L'identification et la caractérisation des mécanismes moléculaires régulant l'inflammation pourront déboucher sur l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques anti-inflammatoires pour lutter contre les pathologies sus-citées. Un de ces mécanismes fait aujourd'hui l'objet de nombreuses études : l'inflammasome NLRP3. En effet, de nombreuses études démontrent que cet acteur majeur du processus inflammatoire, peut subir des modifications au niveau protéique. Ces modifications peuvent alors engendrer des maladies inflammatoires telles que les maladies CAPS (l'urticaire familiale au froid, Muckle Wells et CINCA).

Notre projet consiste donc à générer des souris génétiquement modifiées exprimant des mutants de NLRP3 dans le but d'étudier les mécanismes régissant l'activation du processus inflammatoire.

Nous projetons de générer au maximum 6 lignées de souris C57Bl6J génétiquement modifiées avec pour chacune de ces lignées 1000 souris maximum, soit 6000 souris maximum. Le nombre de souris pourra être modulé à la baisse selon les résultats obtenus.

Dans le but de répondre aux exigences de raffinement, nous avons établi des points limites adaptés à notre étude. Afin de prévenir la souffrance des animaux, nous veillerons à détecter d'éventuels cas d'auto-inflammations spontanées dues aux mutations de NLRP3 générées, par une observation quotidienne. Aucune méthode alternative *in vitro* n'est disponible à ce jour pour répondre à la problématique posée, le processus inflammatoire est trop complexe pour être réduit à l'étude d'un unique type cellulaire (macrophages).

8256 Les maladies inflammatoires sont des causes majeures de morbidité et de mortalité dans le monde développé. Au cours de la réponse inflammatoire pathologique, une production accrue de formes réactives de l'oxygène (FRO/ROS pour Reactive Oxygen Species) par les cellules du microenvironnement est observée. En raison de leur haute cytotoxicité, la production inappropriée et excessive de ROS peut conduire à un stress oxydatif qui peut induire des lésions tissulaires contribuant à la progression des maladies inflammatoires chroniques. Les NADPH oxydases (NOXs) constituent une famille d'enzymes dont l'unique fonction est de générer les formes réactives de l'oxygène (FRO/ROS). Les NOXs sont considérées comme la principale source endogène de ROS et leur dysfonctionnement ou expression anormale pourrait participer au stress oxydatif à l'origine des maladies inflammatoires chroniques.

Pour de nombreuses maladies inflammatoires chroniques, telles que les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin et la polyarthrite rhumatoïde, les solutions thérapeutiques restent insuffisantes. C'est dans ce contexte de santé publique que se tient notre projet d'étude qui visera à valider *in vivo* les NOXs comme cibles thérapeutiques clés pour le traitement des maladies

inflammatoires, et à évaluer in vivo l'action anti-inflammatoire de nouveaux peptides inhibiteurs des NOXs ou de nouvelles molécules qui inhibent leurs voies d'activation et que nous avons récemment identifié.

Nous testerons un peptide compétiteur que nous avons développé et qui inhibe in vitro l'hyperactivation de NOX2 des neutrophiles issus du liquide synovial de patients arthritiques. Nous testerons également l'effet de l'apocynine une molécule pharmacologique qui inhibe l'activation des NOXs, la juglone, l'IC-11 et le L75, des molécules qui inhibent les voies d'activation des NOXs. Excepté pour l'apocynine qui a été testé dans de nombreux modèles d'inflammation et qui nous servira de référence, l'effet du peptide compétiteur de NOX2, de la juglone, de l'IC-11 et du L75 n'a jamais été évalué dans les modèles d'inflammation intestinale ou articulaire.

En ce qui concerne les modèles d'inflammation intestinale nous utiliserons trois modèles complémentaires : 1) le modèle induit chimiquement par le TNBS chez la souris qui initie une réponse inflammatoire en déclenchant l'activation des macrophages et qui est particulièrement adapté pour identifier l'effet anti-inflammatoire des agents à tester. 2) Le modèle induit par l'injection chez la souris de TNF alpha, une cytokine majeure de l'inflammation intestinale, qui permet de mimer la phase active de la maladie et de voir l'effet préventif de nos peptides ou molécules inhibitrices. 3) le modèle induit chimiquement par le DSS chez la souris qui endommage directement les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale par un phénomène d'hyper-osmose et qui permet de suivre la régénération tissulaire associée au traitement.

En ce qui concerne les modèles d'arthrite, les modèles d'arthrite rapide et chronique seront utilisés : Le modèle d'arthrite rapide induit par l'injection la carrageenine chez le rat est adapté pour l'étude préventive et le modèle chronique induit par l'injection d'anticorps monoclonaux permettra d'évaluer l'efficacité du traitement en cours.

Divers paramètres cliniques, biologiques, biochimiques et histologiques seront analysés afin d'évaluer l'effet bénéfique ou non de nos peptides et molécules inhibitrices du stress oxydant dans ces modèles.

L'utilisation de ces différents modèles d'inflammation intestinale ou articulaire permettra d'aboutir à une application thérapeutique qui est soit préventive soit active sur la progression de la maladie.

Ce projet se déroulera sur une période de 5 ans avec la participation de deux chercheurs maîtrisant les procédures d'induction de l'inflammation intestinale et articulaire (formés à l'expérimentation) et dans des locaux agréés. Ce projet nécessitera un nombre total de 432 souris et 90 rats, soit 522 animaux au total.

La conformité avec les exigences de réduction, raffinement et remplacement seront pris en compte : 1) réduction; dans ces différents modèles le taux de mortalité est faible (environ 10%), nous avons déterminé le nombre d'animaux nécessaire et suffisant dans chaque sous-groupe pour avoir des résultats statistiquement exploitables à 6 par sous-groupe. 2) raffinement, les méthodes et les mesures choisies visent à diminuer au maximum les contraintes imposées aux animaux. Une période d'acclimatation d'au moins 5 jours dans les mêmes conditions environnementales que celles qui prévaudront lors du protocole expérimental est prévue afin de stabiliser les animaux au point de vue physiologique et comportemental et de diminuer leur stress. Une anesthésie sera effectuée lors des procédures douloureuses pour l'animal et l'utilisation d'antalgiques sera envisagée si l'animal présente des signes de douleur au cours de l'expérimentation. Les signes extérieurs de souffrance (perte de poids au-delà de 20-25 % par rapport au groupe contrôle, prostration, poil hérissé, saignements) seront les critères de point limites à partir desquels nous procéderons à l'euthanasie de l'animal. 3) remplacement ; les connaissances issues de cette étude in vivo ne peuvent pas être obtenues actuellement par d'autres méthodes compte-tenu de la complexité physiologique de la réponse inflammatoire qui nécessite de travailler à l'échelle d'un organisme.

8257 L'hypertension artérielle touche les hommes et les femmes en proportion équivalentes, cependant, des différences inter-sexes concernant l'âge d'apparition de la maladie sont observées. Entre la puberté et la ménopause, les femmes présentent en moyenne des valeurs de pression artérielle systolique (PAS) inférieures à celles des hommes, alors qu'à partir de la sixième décennie cette tendance s'inverse. Ce dimorphisme sexuel de la physiopathologie de l'hypertension est directement lié aux différences de concentrations sanguines en hormones sexuelles (testostérone et œstrogènes)

entre les hommes et les femmes. Même si les mécanismes exacts, à travers lesquels les hormones sexuelles contribuent à la régulation de la pression artérielle sont encore mal connus, de plus en plus d'études suggèrent l'importance de l'action locale de ces hormones sur le système vasculaire systémique, sur la vascularisation de certains organes cibles et leur fonctionnement. Depuis de nombreuses années, l'activité physique (AP) est considérée comme une stratégie non pharmacologique de premier choix dans la prévention et dans le traitement de l'hypertension. Bien que les sociétés savantes recommandent de réaliser des exercices continus d'intensité modérée (ECIM) pour bénéficier de l'effet cardioprotecteur de l'activité physique, de récents travaux montrent que les exercices intermittents à haute intensité (EIHI) ont des effets bénéfiques plus marqués sur les caractéristiques physiopathologiques de l'hypertension artérielle.

Le but de ce projet est donc de déterminer les effets d'un entraînement de 8 semaines par EIHI sur le remodelage du réseau artériel chez un modèle de rate hypertendue (SHR) ovariectomisée puis de définir l'influence des hormones sexuelles féminines dans ces adaptations à l'entraînement. L'ensemble des expériences (réalisées sur organes et tissus prélevés à l'issue de l'entraînement) sera réalisé sur 80 rates de souche SHR (Spontaneously Hypertensive Rats) âgées de 12 semaines au début du protocole. Les rates seront réparties en 4 groupes (20/groupe) : 1) ovariectomisées, entraînées (OVX-E), 2) ovariectomisées, sédentaires (OVX-S), 3) opérées placebo, entraînées (SHAM-E) et 4) opérées placebo, sédentaires (SHAM-S).

Le respect de la règle de raffinement est assuré par l'utilisation de la technique d'échographie non invasive, l'entraînement est précédé d'une phase d'habituation qui limite leur stress, et enfin l'ovariectomie sous anesthésie fait l'objet d'un traitement antalgique pré et post opératoire. Les rates sont hébergées dans une animalerie agréée en milieu enrichi à 2 par cage. Une surveillance quotidienne est assurée et une pesée hebdomadaire permet de s'assurer de la bonne santé des animaux durant l'ensemble du protocole. Afin de respecter la règle de réduction, le nombre des animaux a été ajusté au nombre minimum nécessaire à l'obtention de résultats significatifs, de plus, après euthanasie certains organes seront prélevés et transférés à des équipes de recherche dans le cadre de collaboration. Cette approche fondamentale demande de travailler sur l'aorte et le cœur d'un animal ayant subi une ovariectomie ainsi qu'un entraînement physique sur tapis roulant. Nous ne pouvons donc pas utiliser des méthodes expérimentales alternatives de remplacement.

8258 Les maladies infectieuses (respiratoires, diarrhéiques, nosocomiales, etc.) sont responsables de 43% des décès dans les pays en développement et de 2% des décès dans les pays développés. En France et dans les pays développés, les décès dus aux maladies infectieuses ont très nettement diminué grâce à une amélioration des conditions de vie, de nutrition et des systèmes sanitaires mais également grâce au développement et à l'accessibilité à un large panel de solutions thérapeutiques (antibiotiques, vaccins). Cependant, depuis quelques décennies, le retour de maladies infectieuses disparues et l'émergence de maladies nouvelles ont été observés. Les principaux facteurs responsables sont les changements sociétaux qui ont conduit à l'apparition de résistance aux antibactériens de nombreux pathogènes. Des progrès thérapeutiques doivent donc encore être réalisés afin de découvrir de nouvelles molécules antibactériennes ou d'optimiser l'utilisation de molécules déjà existantes.

Ce projet a pour objectif de développer et de caractériser des modèles infectieux chez la souris et le rat, à travers différentes modalités d'infection : infection liée à la pose d'un dispositif médical ou infection d'un organe/tissu (peau, muscle, poumons, etc.) dans le but d'évaluer l'efficacité de différents produits antibactériens sur ces modèles. Lors de ce projet, l'imagerie médicale sera utilisée afin de suivre l'infection (bactéries rendues bioluminescentes) et/ou la bio distribution de produits antibactériens (produits couplés à une molécule fluorescente). Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives (requiert seulement l'anesthésie des animaux) et ne nécessitent pas d'euthanasie d'animaux au cours du temps (suivi des mêmes animaux au cours du temps - diminution de l'impact de la variabilité individuelle). Elles permettent ainsi de diminuer le nombre d'animaux nécessaire et sont donc éthiques.

Différentes études seront réalisées au cours de ce projet. Le nombre de groupe sera variable, pour chaque étude, en fonction du nombre de conditions expérimentales à tester. Un nombre maximal de

2000 souris et de 800 rats, dans l'ensemble du projet, pourra être utilisé. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 2800.

Afin de répondre aux objectifs de ce projet, le recours à l'expérimentation animale est nécessaire car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthode alternative permettant de modéliser de manière fiable l'efficacité et/ou la bio distribution de produits antibactériens dans un organisme entier vivant. Les espèces rats/souris ont été choisies car c'est des modèles standard polyvalents qui sont régulièrement utilisés dans les études d'infectiologie.

Des critères d'interruption ou « points limites » seront utilisés tout au long de ces études. Un suivi clinique quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe anormal et ainsi prendre les mesures nécessaires (mises en place de mesures de soutien ou euthanasie des animaux) le plus rapidement possible.

Ce projet pourra permettre de proposer sur le marché de nouvelles molécules antibactériennes.

8259 L'utilisation d'anesthésiques locaux par voie topique autorise la réalisation de diverses procédures diagnostiques ou thérapeutiques chez le lapin, en réduisant la douleur ou l'inconfort associés à ces procédures. L'effet de certaines préparations a été étudié chez le lapin, en particulier l'hydrochloride de tétracaine 0,5%, la bupivacaine, la lidocaïne, la procaine, et la benzocaïne.

Les préparations d'hydrochloride d'oxybuprocaïne 0,4% sont couramment utilisées chez l'homme et l'animal lors de procédures chirurgicales ou diagnostiques. Cependant à notre connaissance, aucune donnée n'est disponible concernant les effets de l'hydrochloride d'oxybuprocaïne sur la sensibilité cornéenne du lapin.

L'objectif de cette étude est d'étudier les effets de l'hydrochloride d'oxybuprocaïne 0,4% sur la sensibilité cornéenne de lapins avec un examen oculaire normal et de comparer les effets pharmacologiques et les potentiels effets secondaires de l'hydrochloride d'oxybuprocaïne avec ceux induits par l'instillation d'une solution de tétracaine 1%.

Pour cela 20 lapins seront utilisés. Ce type d'essai ne peut se pratiquer que sur un œil de mammifère vivant, aucune méthode de substitution n'est envisageable; les examens réalisés n'impactent l'animal que très modérément et sont réalisés sous anesthésie afin d'obtenir une immobilité convenable. Ils incluent un examen oculaire complet et la mesure répétée de la sensibilité cornéenne à l'aide d'un esthésiomètre de Cochet-Bonnet. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, un lot de 20 animaux sera constitué pour la première phase. Les mêmes animaux seront utilisés pour la seconde phase comparant les deux préparations d'anesthésiques locaux avec une période de sevrage d'une semaine.

A l'issue de leur participation au présent projet et après vérification de l'absence de lésions par un vétérinaire, les animaux pourront soit être utilisés dans d'autres projets ne comportant que des procédures légères ou dans un projet comportant une procédure modérée, soit être proposés à l'adoption.

8260 Le but de ce projet est de construire un portefeuille de biomarqueurs génomiques d'hypoxie intermittente afin de comprendre les mécanismes à l'origine des conséquences délétères de l'hypoxie intermittente chronique (HIC), un modèle du syndrome d'apnées obstructives du sommeil (SAOS) et de d'identifier des marqueurs permettant de détecter précocement cette maladie. Cette pathologie touche 5 à 20% de la population et est associée à de nombreuses autres pathologies parmi lesquelles, les pathologies cardiovasculaires comme l'hypertension artérielle et l'infarctus du myocarde. Si le traitement actuel de référence du SAOS semble fonctionner lorsqu'il est bien toléré, il apparaît essentiel de comprendre les mécanismes à l'origine de ces pathologies associées dans le but de proposer des compléments ou des alternatives thérapeutiques à ce traitement. Le SAOS est caractérisé par plusieurs composantes dont l'hypoxie intermittente (HI) chronique connue pour avoir le plus fort impact en termes de conséquences délétères cardiovasculaires.

Ainsi, d'un point de vue scientifique, dans le but d'étudier de nombreux mécanismes susceptibles d'expliquer les altérations cardiovasculaires induite par l'HI chronique, l'utilisation de l'expérimentation animale est indispensable.

Nous comptons utiliser 20 rats par an sur 5 ans, soit 100 animaux au total.

Remplacer : l'étude systémique des effets de l'hypoxie intermittente ne peut être réalisée que sur des organismes entiers. Dès qu'il sera possible et en amont des expérimentations de la culture cellulaire ou des simulations seront réalisées.

Réduire : Le nombre minimal d'animaux pour effectuer des analyses statistiques robustes et fiable sera utilisé.

Raffiner : Les animaux seront dans une animalerie contrôlée et leur état de bien-être sera surveillé quotidiennement. Les cages seront enrichies avec des rouleaux, coton et frisures. Une grille de suivi sera utilisée impliquant un score et un arbre décisionnel. Une anesthésie sera mise en œuvre lors des actes qui le nécessitent.

8261 Les dysfonctions microcirculatoires et inflammatoires sont des marqueurs de pathologies, telles que le diabète, et peuvent entraîner des altérations de cicatrifications, de la douleur et des dysfonctions graves pouvant mener à l'amputation.

La voie des acides époxyeicosatriénoïque (EET) représente une nouvelle stratégie pharmacologique dans la prévention des dysfonctions micro-vasculaires. En effet, les EETs sont de puissants vasodilatateurs possédant des propriétés anti-inflammatoires. Une augmentation de la dégradation des EETs par l'époxyde hydrolase soluble (sEH) a été démontrée dans de nombreuses pathologies, comprenant le diabète, menant au développement d'une nouvelle classe d'agents pharmacologiques : les inhibiteurs des sEH.

Le but de cette étude est d'analyser l'effet de l'inhibition des sEH sur la microcirculation cutanée de souris diabétiques obèses, utilisant une nouvelle formulation topique permettant la libération progressive de notre molécule au niveau de la peau. Nous avons choisi de travailler avec une souche de souris BKS, couramment utilisée dans les études liées au diabète et à la cicatrisation. En effet ce modèle murin, de part une modification génétique, déclare naturellement à l'âge adulte une hyperglycémie, une obésité, une insulino-résistance et des dysfonctions microvasculaires. Dans notre étude, nous souhaitons évaluer l'efficacité d'un gel dopé avec un inhibiteur de sEH sur la réactivité microvasculaire (RV) de peau de souris diabétiques. Pour cela nous évaluerons la RV basale du dos des animaux (3 cm au dessus de la base de la queue), nous appliquerons notre gel durant une durée définie selon le groupe choisi, puis nous réévaluerons la RV post application. Ces tests de RV auront lieu sous anesthésie générale gazeuse (Isoflurane).

Afin de minimiser le nombre et l'impact de notre étude sur ces animaux nous appliquons la règle des 3 R :

Réduire : le calcul de nos effectifs est réalisé de manière à utiliser le moins d'animaux sans altérer la puissance et la fiabilité de nos tests statistiques.

Remplacer : pour ce type d'étude il nous est impossible de remplacer l'animal (cellules cultivées, peau de synthèse, simulation informatique)

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes, dans un environnement enrichi et leur bien-être sera vérifié quotidiennement. Des mesures de réduction de la pénibilité seront aussi appliquées (antalgie, suivi quotidien, analgésie, etc.)

Dans ce projet nous utiliserons 48 animaux répartis en 3 groupes en fonction du temps d'application de la molécule : H+2, H+8 et H+24. Cet effectif a été calculé en fonction de la puissance des tests statistiques prévus et des résultats intermédiaires attendu mais également en tenant compte du risque de perte d'animaux. Le suivi régulier des animaux sera réalisé pour s'assurer de leur bien-être.

8262 Ce projet est basé sur une analyse par spectrométrie de masse des récepteurs 2A de la sérotonine, mGlu2 du glutamate, respectivement cibles importantes des antipsychotiques atypiques et des antipsychotiques de prochaine génération dans la schizophrénie. Il a déjà été démontré que la balance d'expression de ces deux récepteurs est déséquilibrée dans les cerveaux des patients schizophrènes et peut conditionner la réponse aux antipsychotiques actuels. In fine, ce projet permettra de mieux comprendre les bases moléculaires de l'action des antipsychotiques actuels et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques contre les symptômes négatifs et cognitifs de la

maladie qui restent encore résistants aux traitements. Un total de 236 souris sera utilisé pour cette étude. Les expériences envisagées sont des injections pharmacologiques et des prélèvements de tissus après anesthésie/euthanasies des animaux en vue d'analyses biochimiques. Nous nous engageons à suivre la règle de 3R grâce aux mesures suivantes : Remplacer : Nous tâcherons d'obtenir le maximum d'informations en utilisant des préparations ex vivo (ex. cultures de lignées et de neurones) avec le minimum de détresse pour l'animal. Le recours aux expériences in vivo aura donc lieu dans les étapes finales du projet en nous focalisant uniquement sur la validation des données les plus prometteuses. Réduire : nous essayerons de réduire le nombre d'animaux utilisés grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Raffiner : Nous vérifierons aussi que les sujets soient utilisés de façon optimale dans le cadre des conditions expérimentales en utilisant les méthodes d'analyse les plus fiables et en surveillant les animaux pour arrêter les expériences en cas de signe de douleur.

8263 Les évolutions actuelles du coût, de l'origine et de la disponibilité des matières premières font qu'il devient de plus en plus important d'améliorer l'efficacité digestive des animaux, afin que ces nouvelles matières premières puissent être sans difficulté incorporées à leur régime alimentaire. Pour répondre à cette question et étudier le déterminisme génétique de ce caractère, nous avons sélectionné avec succès pendant 8 générations deux lignées divergentes de poulets sur leur efficacité digestive. Ces lignées sont depuis reproduites sans sélection supplémentaire sur l'efficacité digestive. Cependant, après 19 générations, la consanguinité a augmenté dans ces lignées, ce qui conduit à une détérioration du bien-être animal et à une dégradation des performances de reproduction. L'objectif de ce projet est donc d'introduire des animaux nouveaux dans les lignées afin de faire baisser la consanguinité. Néanmoins, ces nouveaux animaux n'auront pas été sélectionnés sur l'efficacité digestive et leur introduction va donc diminuer l'écart d'efficacité digestive entre les 2 lignées. Dans un second temps, il sera donc nécessaire de renouveler le processus de sélection pendant 4 générations afin de rétablir l'écart entre les 2 lignées.

La première phase (réintroduction d'animaux nouveaux) portera sur 72 femelles (1 femelle extérieure par coq) afin de permettre de sélectionner les 40 aux performances d'efficacité digestive les plus extrêmes pour la reproduction (1 femelle par coq). Pour la seconde phase, 432 animaux seront mesurés à chaque génération, afin de fournir une base de sélection suffisamment large pour permettre un processus de sélection efficace et limité dans le temps (4 générations). Au total, 1828 animaux seront utilisés.

Respect de la règle des 3R :

- Remplacer : Pour sélectionner sur l'efficacité digestive, il faut disposer des mesures sur les animaux et le modèle le plus adapté pour l'évaluer sur le poulet est le poulet lui-même
- Réduire : des calculs statistiques ont été effectués pour estimer le nombre d'animaux nécessaire à la réalisation de cette expérience
- Raffiner : les animaux sont élevés dans des conditions comparables à celles des poulets d'élevage et le placement en cage individuelle est limité à la durée de la mesure de l'efficacité digestive. Les manipulations seront réduites au maximum afin de ne pas perturber les animaux. Les manipulations (pesée, prise de sang) seront effectuées par un personnel formé et les animaux seront manipulés délicatement. Les animaux seront observés tous les jours, et si un animal se développe mal (cachexie, blessure non soignable en particulier fracture osseuse, perte de poids) et s'il est en souffrance (diminution drastique de la prise d'eau et alimentaire, prostration persistante), il sera aussitôt euthanasié.

8264 Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps. Cette problématique est particulièrement

importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Dans la majorité des cas, les allo-anticorps produits sont dirigés contre des molécules exprimées à la surface des plaquettes, les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), un ensemble de molécules propres à chaque individu.

Caractériser les anticorps anti-plaquettes produits et leurs effets permettrait de mieux comprendre les processus immuns liés à la transfusion chez l'homme.

La compréhension de tels mécanismes nécessite la mise en place d'un modèle animal d'allo-immunisation afin de pouvoir prélever, après la transfusion, différents échantillons (organes, sang, etc.) et analyser la prise en charge des plaquettes transfusées et les mécanismes immuns qui en découlent. Des souris de fond génétique BALB/c (CMH de type H2-Kd) recevront plusieurs injections hebdomadaires de plaquettes provenant de souris C57BL/6J (CMH de type H2-Kb) afin de conduire à la production d'anticorps. Ce modèle nous permettra de caractériser les anticorps antiplaquettaires produits.

Réduire :

Dès que les souris receveuses auront produit assez d'allo-anticorps, les transfusions hebdomadaires seront stoppées. Nous avons pu montrer dans des études préliminaires que 5 transfusions (1 transfusion toutes les semaines pendant 5 semaines) étaient suffisantes pour produire une quantité d'allo-anticorps significative (au lieu de 8 dans les autres études).

De plus, les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront minimalisés, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Afin de réduire le nombre d'animaux nécessaires et dans la mesure du possible, dans les expériences qui l'exigent, le sang et les tissus seront prélevés sur les mêmes animaux.

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront réduites au minimum et remplacées par des études in vitro sur cellules. L'effet des allo-anticorps sera par exemple tester sur des plaquettes sanguines in vitro avant d'étudier leur effet in vivo. Ceci nous donnera une indication sur la quantité d'allo-sérum à injecter aux animaux.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Ils ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Enfin, une fiche de suivi est mise en place pour surveiller les animaux tout au long du processus d'allo-immunisation. La fiche de suivi permettra notamment de surveiller d'éventuelles lésions causées au niveau du site d'injection. De plus toutes les procédures seront faites sur des animaux anesthésiés avec une action antalgique.

Ce projet nécessitera 225 souris.

8265 Les infections du tractus respiratoire, chez l'Homme, sont les plus fréquentes parmi les pathologies aiguës dans le monde, et constituent la première cause de mortalité chez les nourrissons et les jeunes enfants (environ 2 millions de décès/an). Parmi les agents étiologiques responsables de ces infections, les virus de l'influenza, notamment de l'influenza A ont un impact majeur causant des épidémies grippales saisonnières et/ou pandémiques. La prévention de la grippe repose sur une vaccination annuelle, proposée dans la plupart des pays industrialisés aux personnes à risque. Toutefois, les limites de la vaccination en termes de couverture et d'efficacité font appel à la nécessité de traitements antiviraux, principalement lors de cas sévères.

Compte-tenu du choix très restreint d'approches préventives et thérapeutiques efficaces disponibles sur le marché, le présent projet vise à développer des traitements antiviraux innovants contre les virus de l'influenza basés sur de peptides inhibiteurs d'une étape spécifique de l'infection virale. Malgré le progrès des dernières années dans les modèles in vitro de culture cellulaire, il n'est pas possible d'obtenir des informations suffisantes sur l'efficacité et la sécurité d'un vaccin ou d'un traitement antiviral sans faire appel à un modèle animal qui mime la maladie provoquée par ces virus ainsi que la réponse immune associée. De plus, pour la mise sur le marché d'un médicament immunologique, les lignes directrices européennes édictées par l'European Medicines Agency ("Guidelines on

influenza vaccines : EMA/CHMP/VWP/457259/2014") imposent le recours aux modèles animaux. Dans ce sens, les études in vitro ont permis de développer puis de sélectionner de candidats à fort potentiel pour évaluer leur innocuité et leur efficacité chez la souris, un modèle expérimental de choix pour ce type d'infections.

Concernant la procédure expérimentale, le nombre d'animaux utilisés pour le développement de chaque produit sera optimisé, pour réduire au minimum ce nombre. On estime utiliser un maximum de 240 souris/an (pour 3-4 expérimentations d'environ 60-80 souris/test), soit un maximum de 1200 souris pour la durée totale du projet. Ce nombre pourra être révisé à la baisse si un des traitements proposés s'avère très efficace avant les 5 ans de la durée du projet. Les souris seront hébergées dans des conditions adaptées à leurs besoins, en groupes sociaux, avec des moyens de nicher et de se cacher dans leurs cages. Les animaux seront manipulés par du personnel formé à la manipulation de ces espèces. De plus, les signes cliniques que l'infection par ces virus provoque chez les animaux sont bien connus. Ils peuvent alors être anticipés et les manifestations les plus importantes seront traitées pour limiter la souffrance des animaux. Finalement, chaque expérience avec un nouveau candidat antiviral fera l'objet d'une étude rétrospective avant de lancer un nouvel essai, afin de tirer les leçons de l'étude précédente pour améliorer si possible le programme de soins.

8266 La colibacillose aviaire, causée par les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC), est l'une des principales maladies de production entraînant des pertes économiques importantes dans le secteur avicole. La maladie est caractérisée par une infection bactérienne de l'appareil respiratoire conduisant à une dissémination bactérienne systémique et des lésions de divers organes profonds. Les virus influenza aviaires faiblement pathogènes (IAFP) sont une cause fréquente d'infections des voies respiratoires chez le poulet. Les symptômes cliniques qu'ils provoquent sont généralement légers ou à peine détectables. Néanmoins, ils sont soupçonnés d'être un facteur important contribuant à des surinfections bactériennes chez les volailles.

Le présent projet vise à fournir des preuves expérimentales d'un rôle des virus IAFP dans le développement de la colibacillose aviaire chez les poulets co-infectés et déchiffrer les mécanismes par lesquels ces virus peuvent favoriser la colonisation bactérienne et l'infection systémique menant à une manifestation clinique sévère. Plus précisément, nous prévoyons d'effectuer trois études interdépendantes :

Dans une première étude pilote, nous allons infecter des poulets de 2 à 3 semaines avec un virus IAFP et nous allons définir les temps auxquels i) les lésions pulmonaires induites par le virus sont les plus marquées (jour 1 ou 2 post-infection), ii) l'infection virale est déjà résolue mais l'homéostasie immunitaire est encore perturbée (jour 7 ou 14 post-infection).

Dans ce but, nous analyserons divers échantillons (écouvillons trachéaux, poumons, rate) récoltés aux jours 1, 2, 7 et 14 post-infection à partir des animaux infectés ou des animaux témoins. L'analyse de ces échantillons fournira des informations détaillées sur le score lésionnel dans les poumons, la réplication et l'excrétion virale et la réponse immunitaire innée de l'hôte. En réalisant cette étude, nous serons en mesure de concevoir une configuration optimale pour les expériences de co-infection suivantes (voir ci-dessous). Dans l'étude pilote, nous envisageons d'utiliser 72 poulets : 2 répétitions (utilisation de deux souches virales différentes) avec 24 animaux infectés et 12 animaux témoins.

Dans l'étude de co-infection, nous testerons ensuite les effets de l'infection virale sur la physiopathologie de la colibacillose aviaire chez le poulet. À cette fin, nous infecterons des poulets de 2-3 semaines avec un virus IAFP et (aux jours 1 ou 2, et 7 ou 14) nous allons surinfecter les animaux avec la souche APEC O1. Deux jours après l'infection bactérienne, les animaux seront euthanasiés et divers échantillons (sang périphérique, poumons, rate, foie) seront récoltés pour des analyses ultérieures. Des poulets mono-infectés par l'APEC O1 et des animaux témoins seront utilisés pour comparer les données obtenues à partir de ces analyses.

Dans l'étude de co-infection, nous envisageons d'utiliser 180 animaux : 3 répétitions avec 24 animaux mono-infectés par l'APEC O1, 24 animaux co-infectés par un virus IAFP et l'APEC O1 et 12 animaux témoins. Les trois répétitions nous permettront d'étudier la physiopathologie des co-infections virales-bactériennes dans différentes conditions expérimentales (utilisation de deux souches virales différentes et/ou deux lignées de poulet différentes).

Dans la troisième étude du projet, nous allons infecter les poulets de 2-3 semaines avec un virus IAFP afin d'obtenir des tissus pulmonaires infectés par le virus pour des études de co-infection en culture (une approche de co-infection ex vivo). Plus précisément, nous récolterons les poumons des animaux infectés (et des animaux témoins) aux jours 1, 2 et 7 post-infection, puis nous préparerons des coupes de tissu pulmonaire viable en utilisant un microtome particulier. Les coupes seront mises en culture puis surinfectées avec l'APEC O1.

Les analyses sur les coupes de tissu pulmonaire co-infectées comprendront l'analyse de la charge virale ou bactérienne, l'évaluation des lésions épithéliales, le phénotypage des cellules immunitaires et l'analyse des taux d'expression d'un certain nombre de gènes immunitaires. Les données de cette étude seront comparées à celles d'une approche de co-infection ex vivo sur des coupes de tissu pulmonaire provenant de poulets non infectés. La corrélation des résultats des deux approches permettra de valider et standardiser le protocole de co-infection sur coupes de tissu pulmonaire d'animaux non infectés.

Ce modèle de co-infection ex vivo permet la préparation d'un grand nombre de coupes de tissu pulmonaire (préparées à partir de pas plus de 1-3 animaux non infectés) et donc le criblage des effets de diverses souches virales sur la colonisation et dissémination bactérienne. Les résultats de ces expériences aideront à déterminer la seconde souche virale qui sera utilisée pour les expériences de répétition au cours des trois études du projet.

Le projet répond à la règle des 3 R :

Réduction : L'étude pilote visant à déterminer les temps optimaux post-infection virale pour la surinfection bactérienne aidera à la fois à affiner notre approche expérimentale et à réduire le nombre d'animaux dans l'étude de co-infection.

Remplacement : L'approche d'infection ex vivo permettant un dépistage des effets spécifiques d'un grand nombre de souches virales aidera à réduire le nombre d'animaux (expériences de répétition avec pas plus de deux souches sélectionnées) et, à long terme, à remplacer le protocole d'infection animale.

Raffinement : Les animaux seront hébergés dans un environnement contrôlé et enrichi. L'objectif de ce projet étant d'étudier la physiopathologie des infections les traitements permettant de réduire la douleur ne sont pas utilisables, le plus grand soin sera porté au bien-être des animaux par des visites fréquentes des animaux et l'euthanasie des animaux dès atteinte du point limite.

Le nombre total d'animaux sera de 306 poulets pour l'ensemble du projet. Afin de nous assurer que les animaux en début d'expérimentation ne soient pas infectés soit par la bactérie, soit par le virus, ils seront issus d'un élevage EOPS.

8267 De nos travaux antérieurs, l'effet bénéfique de l'association de 5 extraits de plantes (Totum 63) sur le métabolisme de souris diabétiques a été mis en évidence, notamment sur la glycémie, la tolérance au glucose et à l'insuline, le profil lipidique sérique et la composition corporelle des animaux. Nous avons décidé par la suite de purifier cet extrait (VAL63000NH).

L'objectif de cette étude est de réaliser un effet dose de cet extrait purifié et de voir l'efficacité de ces différentes doses sur le métabolisme de souris diabétiques, en comparaison avec notre extrait brut de 5 plantes.

L'étude a été réalisée selon la règle des 3 R (réduire, raffiner, remplacer) :

- L'étude se compose de 5 groupes de 10 souris diabétiques âgées de 6 semaines en début de protocole. Les traitements seront incorporés dans la nourriture des animaux pour une durée de 6 semaines. Une justification statistique prédictive du nombre d'animaux nécessaire par groupe a été établie à partir de travaux similaires réalisés sur le même modèle, un minimum de 10 animaux par groupe est ainsi nécessaire pour mettre en évidence un résultat statistiquement significatif.

- Les procédures réalisées sur les animaux (pesée, composition corporelle, mesure de la glycémie à jeun, gavage aux glucides) sont pour la plupart non-invasives et réalisées sans anesthésie car elles n'engendrent qu'un état de stress minimal. Ces mesures seront réalisées une fois en début (S0) et

une fois en fin de protocole (S6), espacées de 6 semaines afin de réduire la charge de stress sur les animaux.

- Le recours à un modèle in vitro n'est pas souhaitable car les modèles cellulaires de mimétisme du diabète de type 2 sont très incomplets et peu représentatifs du fonctionnement in vivo. Le modèle de souris diabétique est particulièrement bien adapté à l'étude des syndromes du diabète, l'âge des animaux correspond au développement du syndrome métabolique chez ce modèle.

Une attention particulière sera prêtée au comportement des animaux par les expérimentateurs et la personne chargée du bien-être animal afin de surveiller l'apparition éventuelle de signes de douleur chez l'animal, auquel cas ce dernier serait immédiatement sorti du protocole.

Un nombre maximal de 50 souris db/db seront utilisées pour cette étude.

8268 Notre programme de recherche étudie la variabilité génétique et phénotypique des oiseaux en milieu naturel. Le nombre total d'oiseau affecté en combinant l'ensemble des procédures est de 1060 par an (800 mésanges bleues, 200 mésanges charbonnières et 60 canaris domestiques), donc 5300 sur 5 ans. Chaque individu est équipé d'une identification individuelle.

Axe 1. Sélection et évolution naturelle dans des habitats hétérogènes

Ce projet allie des approches d'analyses phénotypiques, de génétique quantitative, et de génomique pour comprendre les processus d'adaptation dans des populations de mésange bleue et mésange charbonnière en utilisant le nombre total d'oiseaux affiché ci-dessus. Dans notre protocole de base, les individus dont on obtient du sang une année ne sont pas re-prélevés les années suivantes. Nous prévoyons également d'équiper des oiseaux avec des transpondeurs sous-cutanés.

Axe 2. Evolution des signaux sexuels

Dans cet axe, nous souhaitons comprendre les facteurs à l'origine de l'évolution des ornements. Nous prévoyons le prélèvement de 8 petites plumes de duvet sur la tête et le collier pour mesurer les colorations jaunes et UV-bleues sur tous les adultes reproducteurs de mésange bleue (environ 700 oiseaux / an) et relier ces mesures à leur succès reproducteur et leur survie. Par ailleurs des expériences en population naturelle visant à mesurer l'agressivité des femelles en réaction à des individus de colorations différentes seront réalisées. Enfin, pour mesurer le lien entre coloration des femelles et l'investissement maternel dans la ponte, deux œufs non incubés (et donc non vivants encore) seront récoltés sur 40 oiseaux pendant 2 ans pour faire des analyses d'hormones et antioxydants.

Axe 3. Evolution des personnalités animales

La question principale que l'on se pose ici est : pourquoi il existe dans la nature des animaux audacieux et d'autres timides ? Pour répondre à cette question, nous souhaitons continuer un protocole déjà existant qui permet d'évaluer la personnalité des oiseaux dans des tests 'openfields', qui requièrent une détention temporaire d'une heure maximum. Tout oiseau qui présente des signes de stress face à cette contention est relâché immédiatement après s'être assuré qu'il n'est pas blessé. Ce protocole concerne environ 300 individus de mésange bleue et 150 individus de mésange charbonnière par an.

Axe 4. Réponses physiologiques et comportementales face au changement climatique

Dans cet axe, nous effectuerons un suivi à la fois en conditions naturelles sur le terrain, et en captivité pour étudier l'influence du développement de la végétation sur la reproduction de la mésange bleue. Jusqu'à 100 individus adultes seront capturés annuellement sur le terrain pour effectuer une prise de sang en vue de déterminer les concentrations d'hormones sexuelles. En captivité, nous utiliserons principalement des individus ayant été élevés à la main (80 oiseaux environ) et qui seront exposés en volières à des substances naturellement présentes dans les bourgeons de chênes. Des tests de comportement en labyrinthe, ainsi que des prises de sang et des mesures de gonades par laparotomies seront effectuées pour mesurer la perception de ces substances et les réponses du système reproducteur à ces substances.

Enfin, un volet de ce projet s'intéressera au rôle de la teneur en eau des aliments dans l'écologie des mésanges dans le milieu méditerranéen. Ceci impliquera des expériences de privation d'eau et de supplémentation en eau, en milieu naturel ainsi qu'en volières (40 individus maximum).

Axe 5. La malaria aviaire chez les oiseaux sauvages

De nombreux passereaux sont infectés par la malaria aviaire causée par différents parasites du genre *Plasmodium*, *Haemoproteus* ou *Leucocytozoon*. Quel est l'impact de ces infections sur les oiseaux ? Est-ce que des mécanismes de résistance ou de tolérance aux infections ont évolué chez les oiseaux ? Est-ce que, à l'inverse, les parasites évoluent en réponse à des changements environnementaux ? Le suivi à long terme de mésanges permet d'étudier en partie les effets des parasites sur la survie et la fécondité des oiseaux. Mais il est nécessaire de compléter ces études par des travaux expérimentaux au laboratoire permettant de suivre les effets de l'infection par différentes lignées de parasites tout au long de la progression de la maladie (durant la phase aiguë qui dure quelques semaines, mais aussi durant la phase chronique qui peut durer plusieurs mois). Ces études permettent de mesurer des phénotypes importants de l'infection (virulence, transmission, guérison) dans un environnement contrôlé. Ces travaux expérimentaux peuvent être réalisés en infectant des canaris (*Serinus canaria*).

Concernant les exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

- Remplacement : Nous ne disposons d'aucune méthode alternative qui remplacerait l'observation et la manipulation des animaux vivants pour répondre à cette question puisque les études en laboratoire ou les modèles mathématiques font largement abstraction de la grande variabilité environnementale observée dans la nature. Cependant, nos travaux expérimentaux sur la malaria aviaire seront réalisés avec des canaris domestiques car ils constituent un modèle biologique bien maîtrisé au laboratoire, et peuvent donc remplacer l'utilisation d'oiseaux sauvages.

- Réduction : Il existe des liens très forts entre les différents axes présentés plus haut. En particulier, les oiseaux utilisés dans les expérimentations (axes 4 et 5) peuvent être utilisés pour répondre à des questions différentes. Notre capacité à structurer nos thématiques de recherche autour d'un même modèle biologique permet de mettre en commun nos connaissances mais aussi de limiter les manipulations et les expérimentations sur les différentes espèces étudiées (en particulier les prises de sang exploitées dans plusieurs axes).

- Raffinement : Nous étudions différentes populations de mésanges principalement in natura, mais pour chaque manipulation, nous avons établi des règles strictes qui limitent au maximum le dérangement des oiseaux. En particulier, la manipulation d'un individu ne doit pas dépasser 20 minutes, et le dérangement d'un nid ou la contention d'un oiseau ne peut pas dépasser une heure. Ainsi, si au bout d'une heure d'attente un parent n'est pas capturé, nous abandonnons la capture.

8269 La population mondiale âgée de 60 ans et plus a doublé depuis 1980 et devrait atteindre deux milliards d'ici 2050. Malheureusement, cette augmentation de la longévité ne semble pas forcément s'associer à un vieillissement dit « réussi » ou en bonne santé. De ce fait, l'allongement de cette durée de vie peut être associé à une qualité de vie altérée, à la fragilité, la dépendance, et l'institutionnalisation des séniors avec un coût de santé publique augmenté. Un des facteurs fortement corrélé à la perte de mobilité, de la fragilité et de la dépendance des séniors est la sarcopénie i.e perte de masse et de fonction musculaire. On sait aujourd'hui que la sarcopénie, est le résultat d'un défaut de régulation du métabolisme des acides aminés (synthèse et dégradation des protéines musculaires), un défaut d'anabolisme musculaire, dont l'origine est multifactorielle : l'inflammation à bas bruit, la lipotoxicité (obésité, régimes western) ou l'insulino-résistance couplés ou non à la malnutrition, la sédentarité ou un état catabolique/pathologie. De plus, les séniors perdent la capacité de récupérer les masses musculaires perdues lors d'incident de vie (alitement, infections, immobilisation, etc.). Les dérèglements métaboliques constatés chez les sujets âgés sont la plupart du temps corrélés avec la présence d'une inflammation à bas bruit. Il a été montré qu'une supplémentation en polyphénols et antioxydants permettait d'améliorer l'anabolisme musculaire chez des rats âgés. Les polyphénols constituent une famille très vaste de composés présents dans les végétaux et que nous consommons par le biais des fruits et légumes. Ces polyphénols ont des propriétés antioxydantes, anti-inflammatoires, et sont également capables d'améliorer la sensibilité à l'insuline. Étant donné la grande variété des polyphénols, il reste encore beaucoup de travail pour connaître les différences

d'effets entre tous les polyphénols. De même, il a été montré qu'une supplémentation en acides gras Oméga 3 pouvait améliorer l'anabolisme musculaire chez des sujets âgés. Dans quelques études mais pas toutes, un effet positif des Oméga 3 sur la masse et la fonction musculaire ont également été obtenus. Les mécanismes ne sont pas clairement compris, mais il a été proposé que les Oméga 3 pourraient également avoir un rôle anti-inflammatoire, améliorer la fonction endothéliale (meilleur approvisionnement du muscle en nutriments apportés par le sang, amélioration de l'effet de l'insuline sur cette fonction), et améliorer la fonction neuromusculaire. L'objectif de ce projet est de comparer de façon précise les effets de deux polyphénols la rutine et la curcumine, des Oméga 3, et des mélanges rutine-oméga 3, curcumine – oméga 3 sur l'anabolisme musculaire chez des rats âgés. Nous pourrions ainsi savoir quel est le polyphénol le plus efficace, comment se situe son effet par rapport à celui des Oméga 3, et s'il existe une synergie entre polyphénols et Oméga 3. Le modèle rat, du fait de sa durée de vie courte, de la présence d'une fonte musculaire liée à l'âge, est le modèle animal le plus proche de l'homme qui permette l'étude du vieillissement et de la sarcopénie. Le protocole proposé s'inscrit dans le respect de la règle des 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) pour l'expérimentation animale. Ainsi, ce protocole ne pourrait pas être réalisé en utilisant des modèles in vitro. Des modèles in vitro (culture de cellules ou de tissus) seraient trop loin des conditions physiologiques réelles, en particulier comme modèle de vieillissement. La mesure de la synthèse protéique musculaire in vivo, sur un muscle entier prélevé dans son intégralité, est certainement la mesure la plus précise et la plus proche de la réalité.

Le nombre de rats par lot a été calculé au plus juste pour permettre de détecter avec une bonne puissance statistique les effets des traitements nutritionnels sur notre critère principal, la synthèse protéique (total de 84 rats). Les animaux seront observés quotidiennement, y compris les week-ends. En cas d'apparition d'un point limite notable ou grave (automutilation, tumeur ou perte de poids >15%) nous utiliserons l'arbre décisionnel afin de décider si l'animal sera soigné ou euthanasié. Nous nous sommes attachés à faire post mortem les mesures les plus pertinentes et les plus complètes. L'impact des polyphénols sur l'anabolisme musculaire au cours du vieillissement reste peu exploré, et à notre connaissance, la synergie entre polyphénols et Oméga 3 n'a jamais été explorée. Ce protocole pourrait fournir des bases solides pour envisager une application chez l'homme.

8270 Certaines maladies génétiques rares sont causées par des mutations de gènes régulant des voies de communication à l'intérieur des cellules, appelées voies de signalisation intracellulaire. Ces voies de signalisation permettent aux cellules de percevoir les signaux (facteurs de croissance, hormones, nutriments, oxygène.) issus de leur environnement et de modifier leur comportement (prolifération, différenciation, migration, métabolisme, etc.) afin de s'adapter aux conditions extérieures. Ces processus sont essentiels au cours du développement et dans le bon fonctionnement d'un organisme. En conséquence, les anomalies génétiques responsables d'une dérégulation de ces voies de signalisation sont à l'origine de nombreuses anomalies, notamment des malformations congénitales, des défauts de croissance, des anomalies endocriniennes ou métaboliques, certaines pouvant avoir des conséquences dramatiques en l'absence de traitement efficace. Si la plupart des mutations génétiques responsables de ces syndromes ont été identifiées, on ne sait souvent pas comment elles induisent les différents symptômes de ces maladies. Pourtant, comprendre les dysfonctionnements provoqués par ces mutations constitue une étape clé pour identifier des cibles thérapeutiques. Les travaux des dernières années ont montré que des souris génétiquement modifiées, portant certaines mutations responsables de ces maladies génétiques (souris Knock In), développent l'ensemble des traits cliniques associés à ces syndromes. Ces souris représentent donc le modèle le plus proche des syndromes humains, offrant ainsi une opportunité unique pour mieux comprendre les mécanismes à l'origine du développement de ces maladies, ce qui ne peut être abordé que dans un modèle animal (principe de remplacement). Les objectifs de ce projet sont donc de caractériser un modèle murin d'un syndrome poly-malformatif associant notamment des anomalies cardiaques et squelettiques et des dérégulations endocriniennes et métaboliques, de déterminer les mécanismes moléculaires sous-jacents, et d'évaluer l'efficacité d'un traitement permettant de moduler l'activation des voies de signalisation.

Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 10 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). La réalisation de l'ensemble

du projet rendra nécessaire l'utilisation de 820 animaux sur une durée de 3 ans. Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal, sous anesthésie lorsque nécessaire pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux, et en respectant des points limites préalablement définis (principe de raffinement).

Au cours du suivi et lors des traitements chroniques, en plus de l'observation quotidienne, une évaluation d'un changement de comportement général (ne s'alimente pas, se laisse attraper sans réagir, ne s'agrippe plus aux barreaux de la grille) ou d'apparence externe (poils hérissés, mal entretenus, pelage terne) sera réalisé 3 fois par semaine. Les animaux seront également pesés 2 fois par semaine pour mettre en évidence un amaigrissement non attendu. Si les animaux présentent des signes de souffrance (comportement général anormal, mutisme > 24 heures) ou une perte de poids > 20% (par rapport au poids au début de la procédure), la procédure sera interrompue et les animaux seront euthanasiés.

8271 Les immunothérapies anti-PD1 restaurent l'immunité anti-tumorale en limitant "l'épuisement" des lymphocytes T. Ces nouveaux traitements ont bouleversé le pronostic du mélanome métastatique avec une survie à 5 ans de l'ordre de 50% au prix d'effets secondaires fréquents et parfois sévères. Pour des raisons encore mal connues tous les patients porteurs d'un mélanome métastatique ne sont pas répondeurs à une immunothérapie et il importe donc de pouvoir identifier ceux qui le seront dès les premières semaines de traitement afin de prévenir les effets indésirables graves du traitement et les dépenses inutiles.

L'angiogenèse joue un rôle clé dans le développement du cancer, fournissant un apport sanguin adéquat à la fois pour la croissance tumorale et la dissémination métastatique. Pendant près de 30 ans, la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux existants a été considérée comme le moyen exclusif de vascularisation tumorale. Dans ce contexte, l'angiogenèse tumorale dépendante du facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) était spécifiquement ciblée pour perturber le développement de la tumeur. Ces traitements prometteurs ont reçu beaucoup d'attention et d'investigation et de nombreux médicaments anti-angiogéniques ont été testés pour prévenir la croissance tumorale et le processus de métastase, mais avec des résultats restreints et insatisfaisants.

Au cours des dernières années, divers mécanismes ont été identifiés pour décrire la néovascularisation tumorale. Par ailleurs, un nouveau paradigme vasculaire tumoral indépendant du modèle d'angiogenèse appelé « mimétisme vasculaire » a été introduit par Folberg et coll. au début des années 2000. Le « mimétisme vasculaire » (MV) est un processus de vascularisation tumorale indépendant des cellules endothéliales qui s'explique par la plasticité fonctionnelle et l'agressivité des cellules cancéreuses dont le phénotype évolue pour former des réseaux de type vasculaire qui fournissent un apport sanguin suffisant pour le développement tumoral.

Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de ce mimétisme vasculaire s'expliquent par l'expression, par les cellules tumorales, de marqueurs endothéliaux et tumoraux assurant le développement de réseaux vasculaires tridimensionnels riches en matrice extracellulaire. Cependant, les mécanismes physiologiques à l'origine de ce mimétisme vasculaire ne sont pas totalement compris à ce jour.

Cette nouvelle organisation favorise les opportunités de transfert métastatique qui se trouvent considérablement augmentées. Différentes études cliniques, impliquant des patients cancéreux, ont ainsi rapporté une corrélation entre la formation de vaisseaux par mimétisme vasculaire et une diminution significative du taux de survie à 5 ans.

L'ensemble des données suggère que le mimétisme vasculaire joue un rôle majeur dans le développement tumoral et qu'il constitue une cible potentielle importante pour la prise en charge anticancéreuse. Toutefois, la mise en évidence de ce mimétisme reste difficile et des études complémentaires sont donc nécessaires pour son évaluation à l'aide des diverses techniques d'imagerie disponibles. C'est pourquoi, des études sur animaux sont proposées et envisagées sur 80 souris.

Pour ce projet les principes de remplacement, de réduction et de raffinement seront respectés.

- Le traitement d'organismes intégrés par de faibles doses de toxiques a un caractère de stricte nécessité afin d'évaluer les effets au niveau des différents tissus et organes 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=10 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 (anesthésie, antalgiques), angoisse ou dommage durables que pourraient ressentir les animaux.

8272 Les facteurs de transcription jouent un rôle clef dans le contrôle de l'expression génique. Les patients mutés pour le facteur de transcription HNF1B sont atteints de diabète ainsi que de malformations des reins et du tractus urinaire. Chez ces patients, une déficience de ce facteur de transcription est impliquée dans 30% des malformations et représente donc un enjeu majeur en génétique clinique. Les mutations se traduisent par des modifications complexes de l'organisme que seule l'expérimentation animale, qui mime au plus près l'environnement et les mécanismes d'action, permet de reproduire.

Des informations sur le rôle de cette protéine au cours du développement embryonnaire ont déjà été obtenues. Dans le cadre de cette étude, nous nous attacherons à élucider son rôle chez l'animal adulte.

L'organe ciblé sera le rein et nous inactiverons le gène d'intérêt à l'âge adulte.

Nous utiliserons un modèle de souris génétiquement modifiée qui nous permettra d'inactiver ce gène, spécifiquement au sein des reins de souris mâles, afin d'éviter tout effet de genre, et de façon contrôlée dans le temps. L'inactivation sera réalisée par gavage avec du tamoxifène.

Un prélèvement de sang en intracardiaque sera réalisé sous anesthésie générale afin d'éviter la souffrance et l'angoisse avant l'euthanasie des animaux 30 jours après l'inactivation du gène. L'urine et les reins des animaux seront prélevés post mortem pour analyses.

Le nombre de souris utilisées sera de 40.

Afin de respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux sera réduit au minimum. Il a été démontré que la validité de l'analyse statistique de la biochimie sanguine et urinaire requiert un minimum de 20 animaux par lot. C'est donc cette valeur que nous nous sommes fixée pour cette étude (20 mutants + 20 contrôles). Tout au long de la procédure, les animaux seront surveillés et des points limites ont été établis permettant d'anticiper la mort de l'animal en cas de souffrance.

Cette étude permettra de comprendre le rôle de cette protéine chez la souris adulte afin de connaître son implication dans les maladies rénales humaines. Ces résultats devraient aboutir à l'identification de biomarqueurs détectables dans l'urine des patients, permettant ainsi de catégoriser l'origine de l'insuffisance rénale et de la corriger de manière précise.

8273 Le système nerveux central remplit des fonctions complexes, intégrant fonctions sensorielles, motrices et cognitives. Son activité repose sur la grande diversité des populations cellulaires qui le composent, neurones mais également cellules gliales. Parmi ces dernières, les oligodendrocytes forment la gaine de myéline permettant une conduction efficace de l'influx nerveux, et constituent des régulateurs essentiels de l'activité du système nerveux central. Ainsi, des altérations de la gaine de myéline, observées dans des situations pathologiques telle que la sclérose en plaques, conduisent à des déficits fonctionnels sévères. La présence des progéniteurs des oligodendrocytes (POL) dans le système nerveux central adulte permet de produire de la myéline tout au long de la vie, et de réparer la myéline altérée dans des cas pathologiques. Cependant, ce potentiel de réparation diminue avec l'âge et reste insuffisant pour pallier aux altérations observées au cours de la sclérose en plaques. Augmenter ce potentiel de réparation de la myéline constitue donc un espoir thérapeutique majeur et nécessite la compréhension, sur un plan fondamental, des mécanismes régulant le développement des oligodendrocytes.

Les projets développés ont pour objectifs de caractériser les gènes majeurs du programme de genèse des oligodendrocytes et d'identifier les signaux nécessaires à la mise en route de ces programmes. Pour cela, un crible moléculaire a été développé et nous a permis d'identifier des gènes qui, de par leur profil d'expression dans la moelle épinière embryonnaire, représentent autant de candidats potentiellement impliqués dans le contrôle du développement des oligodendrocytes. Afin de tester la fonction de ces gènes candidats, nous utilisons notamment le poisson zèbre comme organisme modèle. En effet, le poisson zèbre présente divers avantages expérimentaux, dont la disponibilité d'outils transgéniques permettant de visualiser simplement le développement des oligodendrocytes par simple imagerie et la possibilité de développer des approches génétiques (mutants ou lignées transgéniques) afin de tester la fonction de gènes candidats. Nous souhaitons établir des lignées mutantes pour deux gènes issus du crible moléculaire pour lesquels nos travaux préliminaires indiquent une fonction au cours du développement oligodendrocytaire. Par ailleurs, l'analyse de profil d'expression d'un autre gène issu du crible moléculaire indique l'existence d'une source encore non décrite d'oligodendrocytes dans la moelle épinière. En effet, l'expression du gène *Sulf1*, que nous avons identifié comme marqueur du lignage oligodendrocytaire, est détectée de manière précoce dans un groupe restreint de progéniteurs neuraux distincts des progéniteurs décrits à ce jour comme source unique des POL pendant le développement de la moelle épinière. Ces résultats suggèrent l'existence possible de sources multiples de POL au cours du développement dans la moelle épinière. Afin de tester cette possibilité, nous proposons d'établir une lignée transgénique permettant de suivre les cellules exprimant *Sulf1* au cours du développement.

L'ensemble de nos analyses sont réalisées au cours des phases précoces de mise en place du système nerveux central, sur des embryons âgés de moins de 6 jours. Les adultes sont conservés uniquement à des fins reproductives. Nous veillons à minimiser le nombre d'animaux hébergés ainsi que les populations d'embryons analysés au cours de nos expériences. De plus, bien que n'utilisant aucune procédure invasive, les animaux font l'objet d'une surveillance quotidienne et sont euthanasiés lorsque des signes de pathologies ou de souffrance sont observés.

La présente demande comprend le maintien de lignées existantes ainsi que la procédure de création de lignées, mutantes pour deux gènes candidats régulateurs potentiels de la production d'oligodendrocytes et transgéniques afin d'analyser le lignage caractérisé par l'expression de *Sulf1*. Un total de 892 embryons seront injectés pour la création de l'ensemble de ces lignées.

8274 Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 18 ans pour les ostéosarcomes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de polychimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte via les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui à leur tour vont activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées in vivo dans des modèles murins syngéniques d'ostéosarcome.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro et l'éventuelle application clinique, 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 4 conditions par molécule testée, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Les expérimentations seront répétées 1 à 2 fois afin d'étudier la reproductibilité des effets observés. Un total de 10 molécules seront étudiées sur une période de 5 ans, 5 pour une stratégie anti-résorption osseuse et 5 en anti-tumoral. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées), et en bithérapie.

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening in vitro. Un total d'environ 1920 souris immunocompétentes est prévu sur une période de 5 ans.

Le bien-être des animaux sera primordial durant les expérimentations, notamment par des phases d'acclimatation, un enrichissement de l'environnement (ajout de carré de cellulose 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.

Afin de raffiner les procédures expérimentales, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible tout signe de douleur. Les animaux anesthésiés seront placés sur un tapis chauffant lors de la réalisation des gestes techniques, une analgésie sera appliquée dès que nécessaire et des points limites strictes seront établis.

8275 L'obésité est une maladie chronique multifactorielle en augmentation dans les pays développés. Elle représente une véritable épidémie au plan mondial. Il s'agit d'un enjeu public car les conséquences de l'obésité sont nombreuses, médicalement graves et onéreuses. Une partie des diabètes diagnostiqués (44%), des maladies cardiaques ischémiantes (23%) et des cancers (7 à 41% selon les types) aurait pour facteur déclenchant principal le surpoids et l'obésité.

Le tissu adipeux est un organe hautement spécialisé qui stocke l'excès d'énergie et le libère au besoin. L'obésité se développe lorsque la consommation de calories dépasse la dépense énergétique et s'accompagne d'une augmentation de la taille des adipocytes et de leur nombre. Mais le tissu adipeux n'est pas qu'un simple tissu de réserve, il est également un organe sécrétoire actif qui élabore une variété de molécules messagères : les adipokines. Ces cytokines particulières participent activement à la régulation de nombreux processus biologiques. Lors d'obésité, la sécrétion de certaines adipokines comme la leptine et l'adiponectine est fortement modifiée. L'obésité est donc associée à une augmentation modérée mais chronique d'un « cocktail » de facteurs inflammatoires et à une diminution de la production d'adiponectine.

La leptine, a un rôle fondamental dans le contrôle des voies hypothalamiques du métabolisme énergétique et dans le métabolisme des tissus périphériques (foie, muscle, pancréas, système immunitaire). La leptine est reconnue comme une cytokine pro-inflammatoire. De son côté, l'adiponectine a des propriétés anti-inflammatoires et insulino sensibilisatrices. Même si les adipokines les plus étudiées pour leurs liens avec l'homéostasie pondérale et la sensibilité à l'insuline restent la leptine et l'adiponectine, d'autres molécules sont étudiées. Ainsi la visfatine, la résistine, pourraient contribuer à la résistance à l'insuline (résistine, visfatine) lors d'obésité.

Très récemment il a été montré que les adipokines n'étaient pas uniquement sécrétés par les adipocytes chez l'Homme mais également par les glandes sébacées. En effet, il existe des preuves convaincantes que les sébocytes agissent tels les adipocytes, cellule active du système endocrinien, en favorisant le message pro-inflammatoire via la libération de la leptine. Les sébocytes sécrètent l'adiponectine, la résistine, la leptine, l'interleukine-6, la serpène E1, la visfatine mais pas l'apeline, la chemerine, la RBP4 (retinol-binding protein 4) et la MCP1 (monocyte chemoattractant protein 1).

Aujourd'hui si le chien est un modèle reconnu de l'obésité humaine, le rôle sécrétoire de la glande sébacée n'a pas été identifié dans cette espèce.

Le but de cette étude est d'objectiver la présence de ces adipokines dans la glande sébacée canine de chien sain puis dans celle d'animaux obèses pour enfin objectiver des différences. Pour cela, douze chiens répartis en deux groupes sont utilisés comme suit :

- Un groupe témoin de chien beagle sain (6 animaux)
- Un groupe de chien beagle obèse (6 animaux)

Ce projet est réalisé dans le respect de la règle des 3R. Le modèle « obésité » est désormais maîtrisé dans notre unité. Le nombre d'animaux est réduit au minimum afin de pouvoir effectuer une analyse statistique fiable. Les conditions d'hébergement et les méthodes expérimentales utilisées sont les plus adaptées pour réduire toute souffrance ou dommage que pourraient ressentir les animaux.

8276 Les tumeurs osseuses primitives ont une faible incidence (300 nouveaux cas par an en France) affectant préférentiellement des adolescents et jeunes adultes (pic de survenue à 15 ans pour les sarcomes d'Ewing et 18 ans pour les ostéosarcomes, les deux tumeurs osseuses primitives les plus fréquentes). Malgré des avancées dans la prise en charge de ces tumeurs par des cures de poly-chimiothérapie moins agressives associées à une chirurgie large de la tumeur en zone saine et conservation du membre, les taux de survie demeurent très faibles pour les formes métastatiques d'emblée ou pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie (20-30% à 5 ans). C'est pourquoi il est nécessaire de définir de nouvelles stratégies thérapeutiques pour ces groupes de patients qui demeurent à haut risque.

Le développement tumoral en site osseux est associé à un dérèglement par les cellules tumorales de l'équilibre apposition / résorption osseuse, appelé « cercle vicieux » : les cellules tumorales induisent la production (directe ou indirecte via les cellules stromales ou les ostéoblastes) de facteurs activateurs des ostéoclastes (tels que RANKL, TNF, IL-6, PTH-rP...) qui vont induire la différenciation et l'activation de précurseurs ostéoclastiques en ostéoclastes matures capables de dégrader l'os. Lorsque la matrice osseuse est dégradée, elle va permettre la libération de facteurs de croissance stockés dans cette matrice qui vont à leur tour activer la prolifération des cellules tumorales. L'hypothèse thérapeutique développée dans le laboratoire est de bloquer ce cercle vicieux entre prolifération tumorale / résorption osseuse en ciblant à la fois les cellules tumorales et les cellules osseuses.

Le projet portera sur le développement de nouvelles approches thérapeutiques des tumeurs osseuses primitives par l'utilisation de molécules, antisense, miRNA à activité anti-tumorale et/ou anti-résorption osseuse en monothérapie ou en bithérapie. Ces approches seront testées in vivo dans des modèles murins xénogéniques d'ostéosarcome ou de sarcome d'Ewing.

Ces expérimentations sont indispensables au bon déroulement du projet, permettant de faire un lien entre les résultats obtenus in vitro, et l'éventuelle application clinique. Elles sont incontournables avant une application 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 4 conditions par molécule à tester, soit un total de 32 animaux par expérimentation. Nous évaluons à 6 le nombre de molécules anti-résorption et 6 les molécules anti-tumorales, soit 12 molécules au total sur une période de 5 ans. Ces molécules seront testées à la fois en monothérapie dans des expériences d'effet-dose (3 doses testées) et en bithérapie. Chacune des expérimentations sera confirmée une fois. Si les résultats sont homogènes nous ne renouvelleront pas inutilement l'expérimentation selon la règle des 3R. Néanmoins, si les résultats des 2 expérimentations sont hétérogènes ou discordants, nous renouvellerons l'expérimentation (pour un total de 3).

Il s'agit d'un protocole générique qui permettra de faire la preuve de concept préclinique de l'intérêt thérapeutique de certaines molécules pressenties après un premier screening in vitro. Un total de 2304 souris immunodéficientes est prévue sur une période de 5 ans.

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 »). Afin de raffiner les procédures expérimentales, les animaux seront observés quotidiennement afin de détecter le plus précocement possible tout signe de douleur. Les animaux anesthésiés seront placés sur un tapis chauffant lors de la réalisation des gestes techniques, une analgésie sera appliquée dès que nécessaire et des points limites strictes seront établis.

8277 L'asthme allergique est une maladie chronique inflammatoire fréquente des voies respiratoires qui atteint 10% de la population mondiale. Les corticoïdes contrôlent la maladie, mais induisent des effets secondaires et ne permettent pas toujours de prévenir les exacerbations menant parfois à un asthme de phénotype aigu, grave et au décès des malades. A long terme, la maladie induit des modifications structurales de la paroi des tissus pulmonaires, dit remodelage bronchique, qui est à l'origine du déclin de la fonction respiratoire pouvant aboutir à une insuffisance respiratoire chronique. Pour des soucis pratiques et d'éthique, de nombreuses manifestations liées à l'asthme, ne peuvent être étudiées chez un patient asthmatique humain. A contrario, l'utilisation de modèles murins permet l'exploration des différents mécanismes pathologiques. Notre modèle d'asthme allergique avec remodelage utilise les acariens comme pneumallergènes et montre une inflammation pulmonaire, une hyperréactivité des voies aériennes ainsi qu'un remodelage similaires aux manifestations observée chez l'homme. Néanmoins, la réponse inflammatoire peut varier de façon discrète entre souris et homme. Dans ce projet, nous utiliserons un modèle murins humanisés (NSG-GM3) pour étudier in vivo et de façon intégrée la maladie humaine. Au cours de cette étude, le principe des 3R sera appliqué afin de réduire, remplacer ou perfectionner l'utilisation de l'expérimentation animale. En effet, les groupes témoin positif (AR) et négatif (CTL) seront regroupés pour le traitement réduisant ainsi le nombre d'animaux utilisé. De plus, l'étude appliquera le principe de raffinement en utilisant un anesthésique local (lidocaïne) pour les prélèvements de sang à la queue, anesthésiants les souris sur tapis chauffant et réalisant les expériences de flexivent et plethysmographie dans une pièce isolée afin d'éviter tout stress de l'animal. Il est impossible de reproduire efficacement les systèmes biologiques très complexes et en particulier le système immunitaire uniquement par des systèmes in vitro ou in silico. Au cours de ce projet de 5 ans, nous effectuerons des analyses immunologiques et physiologiques pour chaque traitement test. Ces traitements déjà testés in vitro utilisent l'augmentation ou le blocage de cytokine de la famille gamma c ayant été montré comme ayant un rôle prépondérant dans la pathologie. Ainsi nous testerons 6 traitements (IL-2Cx, IL-15Cx, IL-7Cx, IL-9Cx, IL-21Cx, IL-4Cx) à raison de 12 souris par groupes et 2 groupes (contrôles et asthmatiques). Soit un total de $24 \times 6 = 144$ souris auquel s'ajoute un groupe de souris sera utilisée comme souris contrôle traité isotype (témoin négatif) et un groupe de souris asthmatiques traité corticoïdes comme témoins positifs. Soit $144 + (24 \times 2) = 192$. Soit un total de $192 + 24$ (souris contrôles et asthmatiques non traitées). De plus, les souris seront humanisées de 2 manières différentes (soit avec des cellules souche soit avec des PBMC de patients asthmatiques ou de volontaires sains). Soit un total de 432 souris. Ces exigences visent à s'assurer que les procédures nécessaires à l'élevage et à l'expérimentation seront exécutées efficacement, avec les soins appropriés afin de minimiser la souffrance des animaux. Vu la quantité d'analyses et le nombre de souris par groupes, le nombre de protocole a été adapté de façon à ce que cela soit réalisable de manière correcte. Ainsi, chaque expérience est réalisée sur 3 souris/groupes et les expériences sont répétées. Néanmoins au vu de la durée de chaque protocole (environ 2 mois plus les analyses), une période de 5 ans a été sélectionnée.

8278 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique qui affecte le système nerveux central (SNC). La SEP est généralement diagnostiquée entre 20 et 40 ans, elle touche 2,5 millions de personnes dans le monde, environ 80 000 patients en France, et atteint deux fois plus les femmes que les hommes. Elle représente ainsi la première cause de handicap chez les jeunes adultes. La SEP est une maladie inflammatoire chronique caractérisée par la destruction par le système immunitaire de la myéline, molécule qui sert à isoler et à protéger les fibres nerveuses. Ainsi, les traitements de fond de la SEP reposent sur des molécules immunosuppressives, qui restent incomplètement efficaces sur le long terme. Il est donc urgent de trouver de nouvelles options thérapeutiques. Dans ce projet, nous utiliserons un modèle expérimental chez la souris d'inflammation du SNC appelé l'encéphalomyélite expérimentale auto-immune (EAE) qui constitue le modèle animal d'étude de la SEP pour identifier les mécanismes régulant la production de molécules immunosuppressives dans le SNC. Ainsi, les résultats attendus de notre étude aideront au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques de la SEP, plus ciblées et plus efficaces. Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser un maximum de 3144 animaux sur 5 ans. Le projet incluant deux procédures sévères, une étude rétrospective sera effectuée à la fin du projet.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet.

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

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

3-Raffinement : les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Du coton ou de l'essuie-tout sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentation font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

8279 Le carcinome hépatocellulaire (CHC) représente 90% des cancers du foie et est le sixième cancer le plus répandu dans le monde. C'est un cancer au pronostic sombre avec un taux de survie à 5 ans faible, faisant du CHC la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde. L'une des causes des échecs thérapeutiques est la détection trop tardive de celui-ci. En effet, seuls les stades les plus précoces peuvent prétendre à un traitement curatif ce qui représente 30 à 40 % des cancers primitifs du foie. Ainsi, le but de cette étude est de mettre en place un dispositif médical le moins invasif possible et immédiat, permettant de diagnostiquer un CHC dans les étapes les plus précoces.

Cet outil aurait l'avantage aussi d'apporter une aide importante au guidage de la biopsie. La chaîne de diagnostic actuelle repose sur des techniques d'imagerie, tel que l'échographie ou l'IRM, et la biopsie. Cette chaîne de diagnostic présente certaines limites notamment dans le diagnostic précoce du cancer du foie. En effet les techniques actuelles sont limitées sur les nodules inférieurs à 2 cm. De plus 40% des CHC ne possèdent pas de profil typique à l'imagerie. Il existe donc un enjeu majeur dans le développement de nouveaux outils d'imagerie pour permettre un diagnostic précoce des patients, et ainsi leur donner un accès aux traitements curatifs.

Ce dispositif repose sur l'analyse de la fluorescence naturelle des tissus. En effet certaines molécules qui sont produites par les cellules, ou qui constituent les tissus, sont naturellement fluorescentes et ont été décrites dérégulées lors de la présence d'un cancer. Le dispositif est en partie constitué d'une aiguille comprenant une fibre optique qui permet de mesurer la fluorescence naturelle des tissus. La platine optique et le logiciel permettent par la suite de récolter les données et de les analyser. Une étude de faisabilité sur 67 résections de foie humain a démontré que la fluorescence était différente entre les tissus sains et les tissus tumoraux. Ce projet fait l'objet d'un financement ANR d'approfondir la compréhension et la caractérisation des signaux d'autofluorescences in vivo qui ont été observés sur les expérimentations ex vivo, notamment par le développement de modèles murins d'hépatopathies et de CHC.

Le modèle d'hépatopathie a permis de démontrer que les modifications de fluorescence étaient bien liées au cancer et non au contexte dans lequel il se développe. L'un des modèles que nous nous proposons de développer pour l'étude du CHC est un modèle de souris ayant reçu des greffes de cellules tumorales humaines dans le foie. La mesure de fluorescence à l'aide du dispositif sera réalisée en comparaison, à l'intérieur et à l'extérieur de la tumeur.

Cette étude comporte deux procédures avec un nombre total de 80 souris.

Règle des 3Rs (Réduire, Remplacer, Raffiner) :

1/ Pour réduire le nombre de souris utilisées : une procédure pilote utilisant un nombre restreint d'animaux, permettra de déterminer les meilleures conditions expérimentales en déterminant le temps optimal de développement des tumeurs et le nombre de cellules à greffer. Cette méthode nous

permettra de réduire le plus possible le nombre de souris utilisées, tout en préservant la qualité de la recherche menée.

2/ Remplacer les animaux : Dans le cadre de notre étude en recherche appliquée il est indispensable d'utiliser un modèle expérimental *in vivo* afin d'avoir un organe irrigué et donc un système se rapprochant le plus possible des conditions de diagnostic prévues chez l'homme. De plus l'étude *in vitro* de la fluorescence naturelle des cellules cancéreuses ou des cellules du foie n'est pas représentative de celle d'un organe. En effet les signaux de fluorescence sont la somme de plusieurs molécules du foie qui sont le produit des cellules ou alors des molécules constitutives des tissus. Il est donc nécessaire d'avoir un organisme complet et vivant pour rendre compte des signaux qui seront observés c'est l'homme lors de la présence et de la croissance d'un nodule.

3/ Raffiner les méthodes : les animaux seront hébergés en cages de 5 souris de taille réglementaire pour réduire le stress, avec eau et nourriture *ad libitum*. La salle d'hébergement est munie d'un portoir ventilé et d'une hotte de change afin d'éviter toute contamination. Dans ces expériences de greffe, toutes les étapes du protocole seront réalisées en conditions d'asepsie, sous anesthésie et associées à un traitement antidouleur. Dès qu'un signe de douleur, angoisse, souffrance est détecté, les souris seront euthanasiées. Le but général de ce projet est de valider la capacité de ce nouveau dispositif médical à diagnostiquer les nodules malins du foie.

8280 Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments ou de leur caractérisation au niveau cardiovasculaire des validations sur rongeurs (qui font partie des espèces réglementaires) sont indispensables. Par ailleurs les rongeurs (rats et souris) développent des atteintes CV de façon reproductible et répétable et sont donc des modèles de choix pour étudier le mécanisme d'action des nouveaux médicaments. Il est important par exemple de vérifier l'innocuité cardiovasculaire des molécules en développement en étudiant entre la pression artérielle ou des perturbations éventuelles du rythme cardiaque. Ces mécanismes sont trop complexes et mettent en jeu de nombreuses régulations c'est pourquoi l'utilisation des animaux s'avère indispensable à ce projet.

Tous nos animaux sont hébergés dans des cages avec enrichissement. Pendant toute la durée de nos études, les animaux sont suivis quotidiennement, pesés au moins une fois par semaine afin d'identifier une potentielle souffrance. Si les animaux présentent des signes de souffrances (tels que perte de poids, défaut de toilettage, agressivité, etc.) des mesures sont mises en place pour y remédier et si ces signes devaient persister ou s'aggraver les animaux concernés seront euthanasiés.

Dans ce projet, les animaux peuvent être utilisés sans traitement préalable après avoir effectué leur période d'acclimatation. Dans d'autres cas une ou plusieurs molécules à tester ou une solution saline (pour le groupe contrôle) pourront être administrées pendant plusieurs semaines. Par ailleurs dans certains cas des prélèvements de sang pourront être effectués pour suivre l'évolution de biomarqueurs. En parallèle des éventuels traitements/prélèvements, la pression artérielle pourra être enregistrée en continu par télémétrie. Enfin, les animaux seront anesthésiés pour évaluer la fonction cardiaque avec un cathéter placé dans le ventricule gauche.

Toutes nos expériences ont été développées en référence à des publications scientifiques et des bases statistiques pour réduire le nombre d'animaux nécessaires. Ces éléments permettent de limiter le nombre d'animaux nécessaires à chaque expérience et d'obtenir des résultats statistiquement exploitables. Nous incluons donc pour ces études entre 10 et 15 animaux par groupe. Le nombre de groupe quant à lui varie, car en tant que prestataire de service, les études relatives à ce projet se font sur demande de nos clients qui établissent également le nombre de groupe. Cependant, en nous basant sur notre activité des dernières années nous estimons avoir besoin sur les 5 ans de 1000 rats et 1000 souris.

8281 Ce protocole fait suite à un protocole dans lequel nous avons démontré que l'augmentation de l'expression d'une isoforme courte soluble d'un récepteur sensibilise certaines tumeurs humaines à une thérapie contre un gène muté dans 50 % des mélanomes (anti BRAF), connu maintenant pour être muté dans 7% des tumeurs humaines. C'est donc une cible primordiale en cancérologie préclinique.

Dans ce nouveau projet, nous voulons démontrer que la sensibilisation à la thérapie ciblée est bien liée à l'augmentation de l'isoforme courte soluble et non pas à un effet hors-cible de la molécule testée. Pour ce faire, nous allons co-injecter en intra-tumoral la molécule et une séquence inhibitrice spécifique de l'isoforme courte soluble et observer les effets de cette co-injection sur la sensibilité tumeurs humaines à la thérapie anti-BRAF.

Pour la réalisation de ce projet, nous avons entamé une collaboration avec une société spécialiste de l'interférence ARN in vivo qui va générer une vingtaine de séquences sd-rxRNAs qui seront préalablement étudiées in vitro pour leur capacité à éteindre l'isoforme courte soluble induite. Deux séquences (sur 20) validées in vitro seront ensuite évaluées in vivo.

Le présent projet s'intéresse à l'intervention du microenvironnement tumoral dans la résistance à une thérapie ciblée. Il n'existe pas à l'heure actuelle de modèle pertinent permettant l'étude des interactions tumeur-microenvironnement, l'utilisation d'animaux vivants est donc incontournable, après les études de screening in vitro (sur cellules).

Dans un premier temps, nous testerons la bonne distribution d'un ARN modèle conjugué à un fluorophore dans les xénogreffes 24h après l'injection par voie intra-tumorale soit en 1 point d'injection unique soit en 4 points d'injection. La bio distribution de cet ARN fluorescent sera visualisée de manière non invasive sur souris vivantes anesthésiées par imagerie fluorescente.

Dans un deuxième temps, l'efficacité de 2 ARN validés in vitro sera vérifiée in vivo par comparaison avec un groupe de souris injectées avec une séquence de contrôle des effets hors-cible et un groupe de souris recevant des injections témoins. Cette validation d'efficacité sera également testée en combinaison avec le traitement par la molécule à tester.

Dans un troisième et dernier temps, si les 2 premières étapes sont franchies avec succès, nous testerons l'effet « rescue » des 2 ARN. Dans le précédent protocole in vivo réalisé, nous avons démontré que le traitement de xénogreffes par la molécule à tester les rend sensibles à une thérapie anti BRAF. En effet, les tumeurs témoins qui reçoivent des injections intra-tumorales de PBS ne répondent pas du tout à la thérapie anti BRAF alors que les souris qui reçoivent la combinaison anti BRAF + la molécule voient leur volume tumoral stabilisé jusqu'à 45 jours après la greffe. Nous voulons maintenant voir si contrecarrer la molécule inductrice avec les ARN spécifiques de l'isoforme courte soluble restaure la résistance des tumeurs à la thérapie anti-BRAF.

130 souris au maximum seront nécessaires à la réalisation de l'intégralité du projet.

Les contraintes pour les animaux sont l'injection, la croissance (limitée) et la mesure de tumeurs, le suivi in vivo sous anesthésie à l'imagerie de fluorescence.

Par souci de raffinement, le vémurafénib, qui doit être administré par voie orale, est inclus dans les croquettes de façon à éviter le gavage répété des souris tout au long du protocole.

Afin de réduire au minimum le nombre de souris utilisées, sur la base des volumes tumoraux obtenus lors du précédent protocole, nous avons calculé que 6 souris par groupe sont nécessaires et suffisantes pour obtenir un effet statistiquement significatif (p -value=0.05) avec une puissance de 95%. Par ailleurs, le nombre a été réduit en limitant les tests sur animaux aux seuls deux ARN les plus prometteurs in vitro.

Une expérience préalable a montré que l'oligonucléotide anti sens injecté directement dans les tumeurs est efficace jusqu'à 4 jours après injection. Nous anticipons/espérons que les sd-rxARN devraient être eux aussi efficaces jusqu'à 4 jours auquel cas, outre le suivi du poids des souris et de la taille des xénogreffes sous-cutanées, la manipulation des souris sera limitée à une injection intra-tumorale à l'état vigile 2 fois par semaine. Si l'efficacité des sd-rxARN était plus courte dans le temps, nous adapterions le rythme des injections intratumorales du mélange vivoMetASO + sd-rxARN à 3 fois par semaine.

Toutes les procédures seront effectuées sous anesthésie locale ou générale. Les animaux bénéficieront en tout temps d'un enrichissement environnemental adapté. Une surveillance clinique dédiée, rapprochée et attentive sera mise en place.

8282 La brucellose et la tuberculose sont deux maladies zoonotiques réglementées, dont le contrôle chez les ruminants domestiques reste une priorité de santé publique vétérinaire en raison de leur fort impact

sanitaire et économique. Le contrôle consiste à inoculer dans le derme des animaux des extraits protéiques dits allergènes, qui induisent un état d'hypersensibilité retardée. Suite à l'injection, une réaction locale au point d'injection est observée sur l'animal. Cette intradermoréaction peut être utilisée comme outil de diagnostic pour la brucellose et la tuberculose. Conformément à la directive européenne n°64/432, les allergènes utilisés dans ce cadre doivent faire l'objet d'un contrôle des lots de fabrication obligatoire avant leur mise sur le marché.

Une partie des contrôles sont fait au laboratoire (apparence et pureté du produit) mais le recours au modèle animal reste nécessaire (effet de non-sensibilisation et mesure de l'activité du produit). L'espèce la plus sensible d'un point de vue de la réaction immunitaire locale est le cobaye pour le contrôle des brucellines et des tuberculines animales (aviaire et bovine). Pour ces deux tests, il n'existe pas aujourd'hui d'alternative in vitro. Le protocole mis en place au laboratoire suit le protocole standard décrit dans le manuel de l'OIE et de la pharmacopée Européenne. Ce protocole n'engendre pas de douleur significative chez les animaux au-delà de l'injection dans le derme du produit à tester.

Le nombre d'animaux est défini à 14 animaux par contrôle réalisé, conformément aux prescriptions de l'OIE. Le nombre total d'animaux utilisés par an est fonction du nombre d'échantillons à valider reçus par le laboratoire. Nous estimons ce nombre à 7 lots contrôlés annuellement en moyenne, soit 490 cobayes sur 5 ans.

Pour tester ces allergènes sur les cobayes, nous utilisons des souches de bactéries inactivées, moins virulentes que les souches vivantes et présentant moins de risque pour le manipulateur. Elles sont aussi préférées à l'utilisation de souches vivantes, car celles-ci génèrent moins de contrainte pour les animaux. Les animaux sont hébergés par groupes sociaux dans des cages avec plateforme et enrichissement du milieu de vie avec accès à l'alimentation et à l'eau à volonté.

8283 Notre laboratoire s'intéresse à une maladie génétique qui prédispose les patients à différents types de cancers. Notre objectif est d'identifier les mécanismes à l'origine des cancers chez ces patients et, par extrapolation, à l'origine du développement de certains cancers dans la population générale. Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes pour de nouvelles pistes de traitements anti-cancéreux.

Notre équipe a publié plusieurs articles scientifiques internationaux montrant que 1) les cellules en culture dérivées de ces patients présentent une déficience pour une protéine impliquée dans le métabolisme de la synthèse d'ADN appelée par la suite « protéine d'intérêt » et 2) que cette déficience contribue à l'instabilité génétique des cellules des patients. Puisqu'on sait que l'instabilité génétique favorise la cancérogénèse, nous voudrions savoir si elle pourrait être l'une des causes de l'apparition de cancers chez nos patients. Les expériences de culture de cellules ne suffisent plus pour répondre à cette question. Seule une expérience in vivo - dans un organisme vivant - peut nous permettre d'y répondre.

Pour cela, nous avons généré un modèle de souris totalement dépourvu de notre protéine d'intérêt. Nous souhaitons déterminer si ces souris déficientes développent plus vite des cancers spontanés que les souris normales (60 souris pour cette expérience) ou des cancers chimiquement induits (45 souris pour cette deuxième expérience). Notre équipe a également montré qu'une drogue utilisée couramment avec certaines chimiothérapies peut être utilisée pour contrebalancer les effets de l'absence de notre protéine d'intérêt : elle rétablit la stabilité génétique des cellules des patients dans des cultures de cellules. Nous voudrions tester son effet sur les 2 protocoles d'apparition (60 souris) ou d'induction de cancers (45 souris). L'administration de cette drogue à ces souris déficientes peut-elle avoir un effet prophylactique et prévenir l'apparition de cancers spontanés ou induits, ou bien réduire le nombre de tumeurs ou les rendre moins agressives ? Si tel est le cas, ce traitement pourrait être administré aux patients présentant cette maladie de prédisposition au cancer.

L'expérience d'induction de cancers du côlon se compose d'une seule injection d'un carcinogène puis de l'administration orale d'un agent inflammatoire. Les souris seront suivies quotidiennement pour surveiller leurs paramètres vitaux et éviter toute souffrance. Toutes les souris seront euthanasiées 2 mois après l'injection du carcinogène. L'analyse de cette expérience consistera à comparer, pour chacun des groupes de souris (normales ou déficientes), les observations obtenues grâce à un examen post mortem de l'intestin et du côlon, le comptage et l'analyse histologique des tumeurs.

L'analyse de l'expérience d'apparition de cancers spontanés consistera à suivre les caractéristiques physiques et comportementales des 2 groupes de souris tout au long de leur vie. Un comptage du nombre et du type de tumeurs sera effectué précisément pour chaque groupe de souris à la fin de l'expérience (durée prévue de 24 mois). Nous comparerons les résultats des groupes normaux à ceux des groupes « déficients ».

Le protocole d'induction de cancers colorectaux est efficace (de 50% à 100%), déclenche peu d'effets dommageables hormis des diarrhées et une perte de poids après le traitement inflammatoire. Du bon dosage des inducteurs dépend la balance tolérance des animaux / efficacité du protocole. Il est primordial d'évaluer les concentrations des traitements qui fluctuent avec nos conditions d'élevage et les souches de souris.

Nous effectuerons donc une expérience préliminaire (32 souris) de façon :

- 1) à tester la tolérance de notre souche de souris à ce protocole dans nos conditions expérimentales et à ajuster les doses des inducteurs, pour éviter tout décès en cours d'expérience et minimiser la souffrance éventuelle des animaux.
- 2) à vérifier que le traitement est efficace en terme d'apparition de tumeurs.
- 3) à réduire au maximum le nombre de souris prévues pour notre expérience déterminante.

L'expérience déterminante nécessitera a priori 90 souris comme décrit plus haut. Ce nombre a été calculé pour une efficacité de 50% en termes d'apparition de tumeurs. Mais d'autres protocoles de la littérature décrivent une meilleure efficacité. Nous pourrions donc revoir à la baisse le nombre d'animaux soumis au protocole final si l'efficacité est supérieure à 50%.

Une surveillance quotidienne des animaux déficients et normaux sera assurée pour les 2 expériences d'induction de tumeurs et une grille de paramètres physiques et comportementaux sera mise en place pour nous permettre de surveiller objectivement et efficacement l'état de nos animaux et d'assurer au mieux leur bien-être.

La dernière expérience consistera à suivre l'apparition de cancers spontanés chez nos 2 groupes de 60 souris, 120 souris au total. Une surveillance bihebdomadaire sera exercée avec les mêmes critères d'alerte que ci-dessus pour procéder à l'euthanasie de l'animal avant toute souffrance explicite.

En résumé, ce projet nécessitera au maximum 32, plus 90, plus 120 souris, soient 242 souris. Par des expériences modérément invasives, il nous permettra de savoir si l'absence de notre protéine d'intérêt prédispose au cancer et si oui, à quels types de cancers, et si une drogue d'usage courant, peut aider à prévenir l'apparition de ces cancers ou à réduire leur agressivité.

8284 L'Hydrocéphalie est une maladie congénitale qui se caractérise par une accumulation anormale de liquide céphalorachidien (L.C.R) provoquant la dilatation des cavités du cerveau. Cette maladie touche 1 nouveau-né sur 2000 et le seul traitement actuel des hydrocéphalies consiste à insérer un cathéter pour drainer l'excès de LCR vers une autre cavité naturelle où il peut se résorber. Cependant des complications mécaniques et surtout infectieuses sont possibles et des ré-interventions sont nécessaires car le matériel devient inadapté avec la croissance de l'enfant.

A l'heure actuelle, il est connu que l'hydrocéphalie congénitale semble être la conséquence de mutations de gènes, dont le gène MPDZ, sans que l'on connaisse les mécanismes moléculaires associés à cette pathologie. Pour mieux les comprendre, l'étude chez l'animal est indispensable. Dans ce domaine la création de lignée de souris transgénique c'est-à-dire possédant la même mutation sur un gène MPDZ impliquée dans la pathologie chez l'homme est un outil indispensable pour faire avancer la recherche.

Ce projet vise à générer une nouvelle lignée de souris dont le gène MPDZ sera muté uniquement dans le cerveau et l'oreille interne. Des animaux seront mis en reproduction et maintenu sur 5 ans. La lignée de souris produite ne devrait pas présenter de phénotype dommageable. Néanmoins, si un phénotype dommageable est observé chez les animaux, le projet sera abandonné.

Règle des 3R. Remplacer : Ce projet s'intègre dans un projet plus global combinant différents travaux de recherche complémentaires allant de l'étude biochimique ou bio moléculaire au comportement. Beaucoup d'études in vitro sont donc effectuées en amont de l'utilisation de lignées d'animaux pour

limiter au maximum leur utilisation. Raffiner : Pour supprimer l'angoisse ou la détresse des animaux au cours de la procédure, les animaux sont élevés en cage collective enrichie. Une inspection systématique et quotidienne du phénotype des premiers nouveaux nés sera mise en place pour détecter tout phénotype dommageable : poche de lait bien remplie, développement moteur normal, croissance normale est réalisé par le zootechnicien. Toute anomalie sera répertoriée dans un fichier via l'outil informatique de gestion des lignées par le zootechnicien qui en informe directement l'expérimentateur. Des critères d'arrêt de procédure suffisamment précoces ont été mis en place pour anticiper toute douleur des animaux.

Réduire : Pour limiter au maximum le nombre d'animaux, un minimum de 3 trios de souris (1 males et 2 femelles par cage) seront utilisés pour produire la génération de souris désirée. Nous avons estimé le nombre total d'animaux nécessaire à la création d'une seule lignée de souris transgéniques est de 129 souris plus 120 souris pour maintenir la lignée sur 5 ans.

8285 Ce projet vise à étudier les effets de stress embryonnaires naturels, artificiels et maternels sur le comportement et l'apprentissage, le système neuroendocrinien et la plasticité cérébrale de juvéniles de poisson à des stades précoces. Le stress prénatal a été le sujet d'un intérêt scientifique spectaculairement grandissant ces vingt dernières années et, de nos jours, il interpelle avec force des domaines aussi différents que la recherche fondamentale, le bien-être animal et la préservation des espèces ou la santé humaine. Chez le modèle téléostéen sélectionné, les œufs puis les larves sont autonomes dès la ponte (absence de soin parental). Cela permet d'éviter d'éventuels biais induits par des interventions de la mère. Des facteurs de stress naturels (phéromones d'alarmes) ou artificiels (molécule aversive) seront appliqués pendant la phase embryo-larvaire (durant 96h post fécondation) ou appliqués chez les mères, juste avant la ponte (manipulation). Des analyses à l'échelle infra-individuelle (perturbation endocrinienne, expression de gènes) permettront de mettre en évidence les réponses physiologiques des embryons et des larves, ou, le cas échéant de la mère, à ces facteurs de stress. Pour évaluer les compétences comportementales des larves et juvéniles, des tests seront effectués sur les comportements exploratoires, la réponse à la nouveauté et l'apprentissage. L'espèce utilisée sera un téléostéen modèle (poisson zèbre). Au total 1386 individus seront utilisés dans ce projet. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles. Ils sont toujours élevés en groupe dans des structures d'élevage adaptées à l'espèce avant et après l'application des procédures (Raffinement). Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions des fonctions intégratives des effets de facteurs de stress précoces.

8286 Traditionnellement, les patients atteints de cancer sont traités par des chimiothérapies cytotoxiques interférant avec la division cellulaire, ce qui induit la mort des cellules en cours de division. Cette stratégie présente deux problèmes : (i) de par leur manque de sélectivité cellulaire, ces traitements entraînent une grande toxicité due à la mort des cellules normales en cours de division ; (ii) les patients développent fréquemment une chimiorésistance. Récemment, des thérapies ciblées qui interfèrent avec des molécules nécessaires pour la croissance tumorale ont été développées. Un nombre important de ces thérapies ciblées a été déjà approuvé au niveau clinique, ce qui a amélioré les résultats du traitement contre le cancer. Malheureusement, le développement des thérapies de précision n'est pas encore possible pour certains types de tumeurs, entraînant un mauvais pronostic pour ces cancers.

Le cancer du poumon est l'une des principales causes de décès par cancer chaque année et parmi tous les sous-types de ce cancer, l'adénocarcinome est la forme la plus courante. A ce jour, il n'existe pas de thérapie ciblée pour environ 70% des adénocarcinomes pulmonaires humains. De ce fait, ce type de tumeur est souvent résistant aux thérapies. Le développement d'une thérapie ciblée efficace ne sera possible qu'après l'identification des mutations nécessaires pour la croissance de la tumeur. Ces mutations seront ciblées de façon thérapeutique de sorte que le traitement n'affecte pas les cellules normales. Il convient de noter, que ces thérapies seront également efficaces contre les tumeurs du poumon qui ont développé une résistance à la chimiothérapie traditionnelle avec des alternatives thérapeutiques très limitées et présentant un taux de survie de 15% après 5 ans.

Notre projet a pour objectif de mieux comprendre les mécanismes de résistance à la chimiothérapie classique de l'adénocarcinome pulmonaire afin d'identifier des cibles thérapeutiques soutenant le développement de résistance dans ce type de cancer. Nous avons récemment identifié une cible thérapeutique potentielle dont l'inhibition bloque la croissance d'adénocarcinomes pulmonaires de part une augmentation de la mort des cellules cancéreuses. Nous avons maintenant pour objectif de déterminer si cette cible peut être utilisée dans le traitement de tumeurs résistantes à la chimiothérapie classique. Pour cela, nous implanterons des lignées de cellules cancéreuses pulmonaires humaines dans les poumons d'animaux afin de générer des tumeurs chimio-résistantes après traitement des souris avec une chimiothérapie utilisée chez l'Homme. Des lignées cellulaires chimio-résistantes seront générées à partir de ces tumeurs pour tester in vitro notre cible potentielle dans le traitement de la résistance. A ce jour, aucune méthode alternative ne permet de récapituler fidèlement le tissu vivant et l'utilisation d'animaux de laboratoire (souris) reste nécessaire pour générer une chimiorésistance comparable à celle apparaissant chez l'Homme. La procédure de xéno greffe orthotopique pulmonaire chez la souris et la génération de résistances aux chimiothérapies classiques sont déjà couramment utilisées et optimisées ce qui aura pour avantage d'utiliser un nombre réduit d'animaux par expérience.

Nous demandons pour réaliser l'ensemble de nos expériences 160 animaux maximum. Dans le respect de la règle des 3R, nous combinerons nos études dans le but de restreindre le nombre d'animaux. Afin de respecter la notion de raffinement, le bien-être de nos animaux sera pris en compte de leur naissance à leur mort. Un suivi de la croissance tumorale en luminescence, sans manipulation engendrant une douleur ou un stress de l'animal sera réalisé deux fois par semaine et un suivi journalier des animaux sera réalisé en étroite collaboration entre le personnel de l'animalerie et l'équipe de recherche pour pouvoir agir rapidement et ainsi éviter tout inconfort ou souffrance des animaux. Enfin, les animaux seront hébergés par fratrie et à raison de 5 souris par cage. De plus, chaque cage sera dotée d'un enrichissement du milieu, comme des nids, afin de réduire le stress des animaux.

8287 La stimulation cérébrale profonde est un traitement efficace des symptômes de la maladie de Parkinson. Elle consiste à continuellement stimuler électriquement des zones profondes du cerveau au moyen d'électrodes implantées. Malgré son succès, la lourdeur et la technicité de l'intervention chirurgicale nécessaire à l'implantation du dispositif de stimulation cérébrale profonde empêchent sa diffusion à un plus grand nombre de patients. Cette limitation est principalement liée au caractère invasif de la stimulation : une stimulation moins invasive, visant des zones corticales du patient plutôt que des zones plus profondes, permettrait de considérablement réduire la dangerosité de l'opération.

Des travaux récents ont montré qu'une telle stimulation corticale atténuait efficacement les symptômes moteurs et restaurait un fonctionnement sain des zones profondes du cerveau sur un modèle parkinsonien de singe. Cependant, des essais similaires sur des patients parkinsoniens se sont avérés infructueux. L'échec de cette translation thérapeutique à l'humain peut s'expliquer par deux facteurs. Le premier est que la stimulation corticale tend à induire des réponses à la fois excitatrices et inhibitrices dans les zones profondes du cerveau, dont les effets pourraient se compenser mutuellement. Le second tient à l'épaisseur du cortex humain : l'intensité de stimulation nécessaire pour induire une réponse thérapeutique est si élevée qu'elle engendre des comportements moteurs non désirés.

Ces deux obstacles pourraient être contournés par l'utilisation d'une stimulation corticale en boucle fermée par optogénétique. Il s'agit de stimuler le cortex non plus avec de l'électricité, mais avec des impulsions lumineuses, et d'adapter en temps réel ce signal de stimulation en fonction de mesures de l'activité cérébrale. L'optogénétique permet en effet d'induire une réponse ciblée (purement excitatrice ou purement inhibitrice) et le fait de stimuler en boucle fermée permet une stimulation bien plus parcimonieuse qui pourrait donc limiter les effets secondaires.

Nous proposons de tester cette hypothèse sur des rats présentant des symptômes parkinsoniens (Sprague Dawley). Ces modèles animaux sont bien documentés dans l'étude de la maladie de Parkinson, et l'organisation des structures cérébrales impliquées est proche de l'humain en comparaison à des espèces moins évoluées. De plus, les stratégies de stimulation envisagées, que

nous avons déjà validées sur des modèles mathématiques des structures impliquées, n'ont jamais été testées expérimentalement ce qui empêche l'utilisation de données existantes.

L'évaluation du succès de cette stratégie de stimulation se fera à la fois à partir de données électrophysiologiques (est-elle capable de restaurer une activité « saine » du cerveau ?) et comportementale (donne-t-elle lieu à une amélioration motrice ?). Le protocole proposé vise à réduire au maximum la douleur et le stress induit par cette étude par une observation quotidienne des animaux, la mise en place de points limites adaptés, ainsi qu'à limiter le nombre d'animaux utilisés en mutualisant les protocoles développés. En outre, le suivi du bien-être reposera sur la présence d'enrichissement dans le milieu de vie des animaux afin d'émuler au mieux les conditions de vie extérieures. Nous prévoyons également de tester cette stratégie par électrostimulation à des fins de translation plus immédiate à l'humain. Au total, les expériences envisagées impliqueront 45 rats, dont 30 auront subi des lésions émulant les symptômes parkinsoniens.

8288 L'ischémie mésentérique (IM) est une des urgences abdominales les plus graves, pourtant mal connue des médecins et des patients. Elle correspond à la souffrance intestinale provoquée par l'arrêt brutal du flux sanguin dans l'artère mésentérique supérieure (AMS), principale artère du tube digestif. Dans la plupart des cas, l'obstruction vasculaire est liée à un caillot ou une plaque d'athérome, comme c'est le cas dans l'infarctus du myocarde ou l'accident vasculaire cérébral. En l'absence d'un traitement d'urgence consistant principalement en une désobstruction de l'artère, la quasi-totalité du tube digestif évolue vers la gangrène, entraînant le décès du patient. Cependant la désobstruction vasculaire, indispensable à la guérison, peut paradoxalement aggraver les lésions intestinales. En effet, l'intestin en souffrance perd sa relative imperméabilité aux bactéries constituant sa flore qui vont infecter le tissu et le sang. Ce phénomène est appelé l'ischémie/reperfusion mésentérique (IR). Ainsi, l'IM a une mortalité proche de 70%. Ce pronostic sévère est expliqué par 1) un diagnostic précoce difficile en l'absence de signe clinique ou biologique assez discriminant et 2) un traitement retardé ou inefficace. Ainsi, l'amélioration du pronostic global de l'ischémie/reperfusion mésentérique nécessite une recherche active 1) de biomarqueurs diagnostiques ainsi que 2) de thérapeutiques susceptibles d'atténuer/prévenir les phénomènes aboutissant à la nécrose intestinale et au décès.

Notre projet de recherche s'attachera à étudier et améliorer la connaissance de ces deux facteurs à l'aide d'un modèle expérimental de l'IR mésentérique chez le rat et la souris induite par un clampage de l'AMS :

- Le modèle rat permettra d'étudier, à partir d'un cathéter veineux, différents marqueurs sanguins susceptibles d'être utilisés comme biomarqueurs diagnostiques et de les confronter au degré de lésion tissulaire histologique.

- Le modèle souris permettra l'étude qualitative des modifications hémodynamiques et thrombotiques durant les périodes d'ischémie et de reperfusion en temps réel par microscopie intravitale.

Le polynucléaire neutrophile semble être un acteur physiopathologique clé dans la genèse et l'aggravation des lésions tissulaires d'ischémie/reperfusion. Chacun de ces modèles permettra ainsi d'étudier l'intérêt thérapeutique d'un peptide mimétique du CD31, ciblant les interactions neutrophiles-endothélium, dans la prévention ou l'atténuation des modifications hémodynamiques, thrombotiques, et des lésions intestinales d'ischémie/reperfusion.

Ce modèle animal permettra d'étudier dans des conditions parfaitement homogènes non réalisables chez l'Homme, les conséquences métaboliques et anatomiques aiguës et prolongées de l'IM, et l'analyse de la cinétique de biomarqueurs pendant l'ischémie et la reperfusion. A cet effet, nous utiliserons 100 rats et 80 souris sur une durée expérimentale de 4 ans, nombres qui ont été déterminés de façon à maîtriser et optimiser le modèle animal et obtenir les informations scientifiques recherchées en fonction des risques statistiques d'erreur (5%) et de la puissance des tests (80%). Les procédures nécessiteront des gestes chirurgicaux de laparotomie, de clampage de l'artère mésentérique supérieure, de prélèvement de l'intestin après euthanasie pratiqués sous anesthésie générale profonde et de longue durée avec un monitoring continu systémique et du bien-être de l'animal conformément à la règle des 3R. Les résultats attendus de ce projet sont 1) la détermination de biomarqueurs diagnostiques de l'ischémie/reperfusion mésentérique et 2) l'évaluation thérapeutique du peptide-mimétique du CD31.

- 8289** L'insuffisance cardiaque (IC), incapacité progressive du cœur à fournir un débit sanguin nécessaire aux besoins métaboliques d'un individu dans la vie courante, est la seconde cause de mortalité dans les pays occidentaux et les États-Unis. La réponse définitive au problème d'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit cardiaque. Or, à ce jour, les traitements médicamenteux ou électroniques sont peu efficaces, trop restrictifs et coûteux. Quelques données chiffrées symboliques.
- 75 % des coûts de la prise en charge de l'insuffisance cardiaque sont liés aux hospitalisations ;
 - Le coût moyen par séjour à l'hôpital est de l'ordre de 10 000 € ;
 - 24 % des patients sont ré-hospitalisés dans les 12 semaines qui suivent un premier séjour ;
 - 1 patient sur 5 décède dans l'année qui suit le diagnostic ;
 - Moins de 15 % des patients survivent au-delà de 8-10 ans.

Notre projet est d'expérimenter un nouveau type de mini-pompe cardiaque que nous avons mis au point et qui a pour objectif d'augmenter la performance d'éjection ventriculaire de 30 à 60% à chaque cycle cardiaque chez les patients en insuffisance cardiaque sévère. Ainsi, l'accélération du débit d'éjection raccourcit la phase de contraction, offrant plus de temps au remplissage du cœur et une irrigation myocardique plus performante. Le propulseur, développé en partenariat avec un institut de recherche de renommée internationale et d'une plateforme spécialisée, offre des avantages importants par rapport aux procédés existants. En effet, sa petite taille et son autonomie permettent d'appliquer une technique chirurgicale simple et brève sans mise en place d'une circulation sanguine extracorporelle (CEC), de s'affranchir d'une alimentation électrique externe, ce qui représente un changement radical dans le devenir et la qualité de vie des patients insuffisants cardiaques sévères.

Postulat de base : La réponse définitive à l'insuffisance cardiaque est le rétablissement du débit sanguin.

Pour y répondre, le système utilisera un impulseur rotatif implanté dans le cœur par thoracotomie (incision chirurgicale de la paroi thoracique), situé à l'apex (la pointe) du ventricule gauche et si nécessaire un second impulseur rotatif situé à l'apex du ventricule droit. Ces deux impulseurs sont connectés à une batterie placée dans la région épigastrique. Le moteur respectif des impulseurs est associé à une électrode de stimulation/détection, le tout fixé sur l'épicarde - paroi externe du cœur (par thoracoscopie ou mini-thoracotomie). C'est un système fermé sans extériorisation de matériel électrique ni d'alimentation.

Les différents objectifs des essais animaux sont :

- 1] Amélioration hémodynamique par la mise en action de la turbine, sur un cœur à fraction d'éjection basse
- 2] Concept d'implantation totalement étanche au sein du ventricule gauche
- 3] Synchronisation d'une turbine intracardiaque avec la systole ventriculaire

Le projet nécessitera l'utilisation de 12 animaux, le modèle choisi est le mouton qui permet de reproduire des résultats qui seront applicables chez l'Homme, le REMPLACEMENT de l'utilisation d'animaux ne peut être envisagé dans le cadre de notre étude car il n'est pas possible de remplacer les essais in vivo pour reproduire la physiologie complexe d'un corps entier. Le nombre défini est REDUIT au minimum pour pouvoir tester l'ensemble des paramètres permettant de valider le dispositif. Enfin, tout au long de la réalisation de l'expérimentation, toutes les mesures seront prises pour répondre au bien-être des animaux par des mesures de RAFFINEMENT, lors de l'opération avec la mise en place d'une médication adaptée et lors de la phase de suivi des animaux, qui seront hébergés en groupe sociaux avec à disposition des mesures d'enrichissement (paille, foin, pierre à sel, etc.).

- 8290** L'insuffisance cardiaque (IC) est un problème de santé publique majeure touchant actuellement 1 million de patients en France, et 5,7 millions aux États-Unis. D'après les estimations, ce nombre risque d'augmenter de 46% d'ici 2030. Actuellement, les patients sont classiquement répartis en deux grandes catégories : certains souffrent d'un défaut de la contraction cardiaque (IC dite « à fraction d'éjection réduite » ou ICFER), tandis que d'autres présentent un défaut de la relaxation (IC dite « à fraction d'éjection préservée » ou ICFEP). Notre projet s'intéresse à ce deuxième type d'IC. A ce jour,

l'IC à fraction d'éjection préservée (ICFEP) touche 55% des patients, et est associée à une mortalité plus élevée. Ces données s'expliquent en partie par le réel manque de traitements efficaces pour prendre en charge les patients. En effet, si la survie des patients souffrant d'ICFER a été améliorée au cours des 15 dernières années grâce à l'évolution des thérapeutiques, aucun traitement n'a montré son efficacité pour la prise en charge de l'ICFEP. Les échecs des traitements disponibles sur le marché et l'absence de nouveaux traitements sont dus à la méconnaissance de la maladie et de son développement. En effet, cette maladie est complexe : elle évolue de manière chronique, elle touche majoritairement les femmes, d'un âge avancé (>80 ans), et est associée à de nombreuses comorbidités (diabète, hypertension artérielle, obésité, anémie, insuffisance rénale, arthrite, etc.). A ce jour, les modèles animaux existants dans la littérature scientifique sont très incomplets, et ne permettent pas d'étudier l'ICFEP dans des conditions proches de celles des patients. En effet, le plus souvent, l'emploi d'animaux de sexes mâles, jeunes (10-12 semaines), et développant une dysfonction diastolique très rapide sont préférés, rendant les conclusions des études délicates à extrapoler chez l'homme.

Dans ce contexte, notre équipe a développé un modèle de rat transgénique : le rat Tg β 3. La caractérisation de ce modèle a permis de démontrer que les rats de cette souche développaient spontanément, à partir l'âge de 30 semaines, et sur un mode chronique, un profil très proche de celui des patients, associant une altération du remplissage cardiaque, une incapacité du cœur à s'adapter à un stress cardiovasculaire, et de la fibrose myocardique. L'âge particulièrement avancé de ces rats, et ses caractéristiques phénotypiques font de lui un modèle particulièrement intéressant pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la maladie chez l'homme. Dans la suite du projet, nous prévoyons d'utiliser notre modèle pour étudier l'impact l'obésité, une comorbidité retrouvée fréquemment chez les patients.

Dans notre étude, un accent sera mis pour privilégier des méthodes d'investigations non invasives, et pour optimiser au mieux le nombre d'explorations menées chez chaque animal, ce qui permettra de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=15 suivant), le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer environ 360 rats, mâles et femelles.

Notre modèle d'étude vise à mimer une pathologie complexe et liée au vieillissement, dans ce cadre, il nous est impossible de remplacer par des outils *in vitro*. Cependant, nous veillerons à réduire le nombre d'animaux en effectuant plusieurs manipulations non invasives sur le même individu. Nous raffinerons le protocole en apportant un soin particulier à prévenir le stress ou la souffrance des animaux en mettant en place des mesures préventives et correctives pour lutter contre la douleur et l'inconfort, mais aussi des points limites au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude.

8291 Chez l'Homme et les animaux de laboratoire, une expérience stressante a un impact majeur sur la physiologie de l'intestin, en modifiant notamment la composition et la structure du microbiote intestinal, qui contribue à augmenter le risque de maladies. Un tel impact n'a pas encore été étudié chez les ruminants qui disposent pourtant d'un microbiote très riche, en particulier dans le rumen, qui influence le métabolisme de l'animal hôte. Une meilleure connaissance des liens entre stress et microbiote chez les ruminants contribuerait à élaborer une gestion intégrée de la santé des animaux en élevage. Par ailleurs, de nombreux travaux chez ces animaux mettent en évidence une forte variabilité génétique dans les réactions au stress, et une sélection génétique de lignées d'ovins présentant des réactions extrêmes en réponse à un stress a pu être mise en œuvre.

Le projet proposé ici utilise 60 femelles de deux lignées divergentes sur leur réactivité comportementale à un stress d'isolement social et vise à étudier le lien entre la génétique de susceptibilité au stress et la composition du microbiote intestinal. Pour cela, elles seront soumises à une collecte unique de sang (prise de sang), fèces (collecte manuelle) et contenu ruminal (intubation). Cette procédure est légèrement inconfortable pour les animaux en particulier à cause du prélèvement du contenu ruminal et de la contention. Afin de réduire le stress potentiel généré par ces prélèvements, ces interventions seront réalisées rapidement par des personnes expérimentées et

familiales des animaux. L'animal est placé en contention physique adaptée sans être isolé de ses congénères (ou au milieu de ses congénères). Les prélèvements seront réalisés en douceur.

8292 Campylobacter et Salmonella sont les deux agents les plus fréquemment retrouvés dans les cas de zoonoses (maladies et infections dont les agents se transmettent naturellement des animaux vertébrés à l'homme, et vice-versa). Les volailles ont été identifiées comme sources de contamination dans la majorité des cas de campylobactérioses et salmonelloses. En France, plus de 77% des élevages sont contaminés par Campylobacter et le taux de contamination moyen des carcasses de volaille à l'abattoir pour Salmonella est de l'ordre de 10 %.

Si la plupart des souches de Campylobacter et Salmonella dans les élevages ne provoquent pas de signes cliniques chez le poulet, réduire la prévalence et le niveau d'excrétion de ces deux pathogènes pourrait à terme permettre de mieux maîtriser le risque pour le consommateur et les pertes économiques liées au retrait des lots fortement contaminés.

La France dispose en Bretagne d'un des plus riches gisements d'algues au monde, unique en Europe, avec près de 600 espèces répertoriées et plus de 300 000 tonnes valorisables annuellement. Les algues marines sont une source importante de composés naturels pouvant présenter des activités biologiques intéressantes.

Dans le cadre de deux programmes de recherche, des molécules extraites de différentes familles d'algues seront ajoutées à l'alimentation du poulet de chair dans le but de réduire :

- la colonisation de Salmonella et étudier leur l'impact sur la microflore intestinale. Dans cette 1ere procédure, les extraits ont déjà été sélectionnés in vitro pour leurs activités antibactériennes contre Salmonella et leur innocuité par voie alimentaire déjà évaluée sur des poulets. Les extraits seront distribués dans l'alimentation pendant toute la durée de l'essai.

- la colonisation de Salmonella et Campylobacter, et d'étudier leur l'impact sur la réponse immunitaire du poulet. Dans ces deux autres procédures, les extraits seront choisis pour les essais in vivo après une sélection in vitro selon plusieurs critères : l'absence de toxicité, leurs activités antibactériennes, l'effet de ces composés sur la virulence des bactéries et sur la réponse immunitaire de l'hôte. Les extraits seront distribués dans l'alimentation des poulets pour des durées qui seront définies en fonction des résultats des tests in vitro.

Dans les trois procédures, la durée de l'essai sera de 35 jours, ce qui correspond à la durée pratiquée en élevage, l'épreuve infectieuse sera réalisée par voie orale au premier jour de l'essai pour Salmonella et après 18 jours d'essais pour Campylobacter. Les souches utilisées pour l'inoculation ne sont pas connues pour être pathogènes chez le poulet. Toutefois, l'état de santé des poulets sera évalué aux travers d'examens cliniques quotidiens, du suivi des performances zootechniques et des analyses réalisées sur les prélèvements biologiques.

Les procédures expérimentales seront menées dans le respect de la règle des 3R : réduction du nombre d'animaux utilisés au seuil de la pertinence scientifique et statistique : au total, 450 poulets utilisés ainsi que le raffinement des conditions d'hébergement. Ces mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant l'angoisse potentielle des animaux (respect des densités, eau et nourriture à volonté, enrichissements adaptés, etc.). Le remplacement n'est pas envisageable car les animaux utilisés sont nécessaires pour évaluer l'impact des extraits d'algues sélectionnés sur la colonisation des pathogènes, leur effet sur la microflore ou sur la réponse immunitaire du poulet, le poulet étant une des espèces cibles des affections étudiées.

8293 Le botulisme animal est une pathologie ré-émergente au niveau mondial depuis une dizaine d'années, notamment au niveau aviaire. Cette pathologie est encore méconnue et de ce fait délicate à gérer. Disposer d'un modèle infectieux permettrait d'une part, d'améliorer les connaissances sur la dynamique d'infection du botulisme mais également, de disposer d'un outil efficace pour tester des moyens de lutte pour prévenir ou traiter la maladie et des moyens de gestion d'épisodes d'émergence de la maladie.

Peu de données sont disponibles dans la littérature concernant la reproduction expérimentale du botulisme aviaire (4 études dont 3 publiées dans les années 70). Sur la base de ces études, une équipe a récemment essayé, sans succès, de reproduire la pathologie en conditions expérimentales.

Le botulisme aviaire est dû à la production in situ de la toxine botulique par le pathogène puis à la ré-ingestion de la toxine par l'animal via coprophagie. L'identification des conditions optimales d'implantation de *Clostridium botulinum* au niveau de l'appareil digestif des animaux (au niveau du caecum, la première partie du colon) est donc un prérequis au développement d'un modèle de botulisme aviaire.

Un modèle d'affection du tube digestif a déjà été développé par notre laboratoire. Ce modèle sera testé dans le cadre de ce projet afin de favoriser l'implantation de la clostridie au niveau caecal.

Ce projet a donc pour objectif de déterminer les conditions expérimentales permettant l'implantation de *C. botulinum* chez l'animal.

L'objectif étant dans un premier temps d'obtenir la colonisation caecale des animaux - et non d'obtenir des symptômes de botulisme - des souches de *C. botulinum* non toxiques seront utilisées ; ceci permettra de ne pas induire de signes cliniques chez les animaux.

L'utilisation des animaux pour ce projet est nécessaire et ne peut être remplacée par des expériences in vitro car il n'est pas possible de déterminer les conditions optimales d'implantation de *C. botulinum* dans le caecum en conditions in vitro. Cependant, le nombre d'animaux utilisés sera réduit au maximum. Les tests statistiques basés sur les 4 études actuellement disponibles montrent que des lots de 10 animaux sont suffisants pour obtenir les résultats attendus : 60 poulets seront utilisés pour notre projet. Le suivi de l'implantation de *C. botulinum* se fera via des écouvillons cloacaux et, après euthanasie des animaux, via l'analyse des organes en fin d'expérimentation.

Afin de garantir le bien-être des animaux, le milieu sera enrichi notamment avec des cordelettes suspendues dans les cages qui permettent de stimuler l'activité des poulets. Tous les animaux seront surveillés quotidiennement et les animaux malades ou montrant des signes de douleur seront euthanasiés pour éviter les souffrances à l'écart des autres animaux afin de réduire leur angoisse, et également transportés dans le calme.

8294 Le glaucome est une maladie grave et fréquente, le plus souvent indolore, qui touche principalement les personnes âgées de plus de quarante-cinq ans et peut entraîner une perte de la vision. Aujourd'hui dans le monde, soixante-dix millions d'individus sont atteints, un million en France. L'augmentation de la pression à l'intérieur de l'œil est la principale cause de glaucome. La pression oculaire est due au liquide transparent contenu à l'intérieur de l'œil : l'humeur aqueuse produite et évacuée par les structures à l'intérieur de l'œil. Lorsque le système d'évacuation de l'humeur aqueuse est déficient, elle s'accumule, la pression augmente et endommage les cellules nerveuses de la rétine et le nerf optique responsables de la vision.

L'objectif du projet est la mise en place, au sein de l'établissement utilisateur, de modèles expérimentaux d'hyperpression oculaire chez le lapin, afin de contribuer au développement de nouveaux traitements médicaux visant à diminuer cette hyperpression et à protéger les cellules rétinienne permettant la vision.

Compte tenu des particularités de l'organe concerné, nous aurons recours à des animaux pour établir notre modèle. En effet, l'œil est composé de nombreux tissus de physiologie différente, de compartiments différents interagissant entre eux, ne permettant pas l'utilisation pour l'heure d'un modèle alternatif.

Ce projet nécessitera au maximum sur 5 ans, 4500 lapins adultes. Afin de minimiser au maximum l'impact sur le bien-être des animaux, un suivi quotidien des animaux sera effectué. Des points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces permettant de limiter une éventuelle douleur à son minimum. Les animaux sont hébergés individuellement ou par deux pour les lapins, 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.

8295 La maladie anévrysmale de l'aorte ascendante est une pathologie relativement fréquente et grave, dont les étiologies sont multiples (maladie de Marfan, bicuspidie aortique, maladie dégénérative liée à l'âge). La principale complication est la dissection de l'aorte ascendante dont la prise en charge est une urgence chirurgicale, grevée d'une lourde mortalité. Les anévrysmes (dilatation progressive) et

dissections (rupture aigue partielle de la paroi) sont la conséquence de pathologies du média aortique caractérisées par une disparition des cellules musculaires lisses (CML) et une destruction de la matrice extracellulaire insoluble. La prise en charge thérapeutique actuelle, est actuellement limitée aux bêtabloquants, avec un faible niveau de preuve d'efficacité. Il y a donc clairement un besoin non couvert, et un changement de paradigme physiopathologique qui pourrait conduire à de nouveaux essais thérapeutiques.

De nombreux travaux ont mis en évidence le rôle central de l'activation locale du plasminogène dans la paroi aortique conduisant à une dégradation de la matrice extracellulaire, l'anoïkis des CML et la constitution de zones de dégénérescence mucoïde aboutissant à la création d'un anévrisme.

Notre projet est une « preuve de concept » et vise à démontrer l'intérêt d'inhiber l'activation du plasminogène pour ralentir l'évolution de la maladie anévrysmale et prévenir la dissection aortique.

L'acide tranéxamique est un anti-fibrinolytique, déjà sur le marché et peu onéreux qui agit en se fixant sur les lysine-binding-site du plasminogène, empêchant son activation en plasmine, prévenant ainsi son activité destructrice de la matrice extra cellulaire.

Nous prévoyons donc de développer un modèle de maladie anévrysmale de l'aorte en administrant de l'acide Beta-AminoPropioNitrile en diffusion sous cutané continue par une pompe osmotique (BAPN) à des jeunes souris C57BL6 (modèle déjà développé dans la littérature) et en testant l'efficacité de l'acide tranéxamique dissout dans l'eau de boisson, pour ralentir la progression de l'anévrisme induit par le BAPN.

Les souris seront réparties en 4 groupes selon qu'elles recevront ou non l'acide tranexamique et/ou du BAPN. Dans ce projet nous utiliserons 40 souris.

Les dommages prévisibles sont la douleur après la mise en place de la pompe, ou en cas de survenue de dissection aortique sous BAPN. La douleur et l'inconfort des animaux seront surveillés quotidiennement et les critères de traitement pour soulager l'animal ou les critères d'arrêt définis seront appliqués à temps pour éviter toute souffrance inutile.

Le bénéfice attendu à terme de ce projet est de proposer un nouveau traitement, déjà disponible sur le marché pour les patients atteints d'anévrisme aortique.

8296 La fragmentation des habitats naturels est une des causes majeures de perte de biodiversité de nos jours, provoquée par l'accroissement continu des réseaux routiers. En séparant les individus les uns des autres, les routes affectent le bon déroulement de la reproduction et le maintien de flux génétiques, indispensables à la survie de la population. Chez le hamster d'Europe (*Cricetus cricetus*) en particulier, un déclin des populations est observé depuis les années 1970 en Europe de l'Ouest et s'étend aujourd'hui à toute son aire de répartition jusqu'en Ukraine. Des mesures de protection en Europe de l'Ouest n'ont pas suffi à enrayer ce déclin. Parmi les causes évoquées du déclin, la fragmentation de l'habitat du hamster d'Europe est une cause majeure, modifiant l'habitat de l'espèce et déconnectant les populations et les individus les uns des autres.

La mise en place de corridors (passages à faunes) connectant les différents habitats permet de reconnecter les populations de différentes espèces et ainsi d'éviter l'impact de la fragmentation sur la diversité génétique des populations. Toutefois, les corridors étant des « passages toute faune », il a été démontré que la prédation au niveau des passages nuisait gravement aux populations de micromammifères. Afin de pouvoir limiter la prédation au niveau de ces passages, notamment sur le Grand Hamster d'Europe, il est nécessaire de mettre en place des systèmes anti-prédation à l'intérieur des passages à faune.

Dans ce projet, nous allons déterminer quelles structures anti-prédations sont les plus efficaces. Pour cela, nous allons évaluer le comportement des hamsters face à des passages à faunes avec installation de dispositifs anti-prédation de différents formats et dans différentes conditions (présence/absence de : pression de prédation, d'autres micromammifères, d'aliments appétant de l'autre côté etc.).

14 hamsters seront utilisés dans le cadre de ce projet la première année, plus leur descendance estimée à 100 animaux, dont 30 seront étudiés lors des années suivantes. Tous feront l'objet d'un suivi non-invasif et conservés jusqu'à leur mort naturelle. Concernant la recommandation des 3 R.

Cette étude comportementale ayant spécifiquement pour objet la protection d'une espèce, le Grand Hamster, en danger d'extinction en France, il n'était pas possible d'envisager un modèle de substitution. Toutefois, les individus utilisés sont tous nés en captivité, les effectifs engagés pour les tests comportementaux, en condition contrôlé au laboratoire ou relâchés dans un grand enclos collectif, ont été ajustés au minimum requis pour les statistiques.

Concernant les animaux étudiés en captivité, des alternatives de raffinement ont été mises en place, comme l'enrichissement des cages ou des manipulations limitant au maximum le stress, ceci afin d'améliorer le bien-être des animaux expérimentés. En ce qui concerne les individus relâchés, l'objectif est de limiter au maximum les interventions humaines en fréquence et durée grâce à l'utilisation de dispositifs de suivi automatisé (identification automatisée, caméras et pièges photos infrarouges). Dans la même logique, les rares interventions humaines seront limitées à la période diurne, c'est-à-dire la période d'inactivité et de repos dans le terrier, l'espèce étant crépusculaire/nocturne.

8297 Chez l'homme, la toxine botulique est utilisée dans le traitement des maladies neurologiques caractérisées par une contraction exagérée d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de posture qui peuvent être chroniques et douloureux (spasticité des membres, torticolis, le pied bot équin, contractions de la mâchoire, contraction des paupières entraînant la fermeture répétitive et incontrôlée des paupières, etc.). Le traitement consiste en l'injection de petites quantités de toxine botulique dans les muscles atteints empêchant la stimulation du muscle par le nerf associé. La toxine induit alors une faiblesse des muscles hyperactifs injectés. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé après plusieurs mois.

Des recherches sont donc faites pour améliorer la puissance, la rapidité et la durée d'action des toxines.

L'activité des toxines est testée selon un processus qui débute par une évaluation in vitro (mesure de l'activité de la toxine sur sa cible) puis sur des cultures de différents types cellulaires et ensuite différents types de muscles isolés de rongeurs. Le recours aux animaux n'est fait que si les toxines ainsi testées répondent aux critères recherchés. Elles seront alors testées sur le rat.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de toxines sur la fonction musculaire spontanée de la patte et après stimulation en utilisant 2 méthodes complémentaires largement décrites et utilisées nommées respectivement DAS (Digit Abduction Score) et Force musculaire.

Dans un 1er temps, la toxine ou son solvant (milieu dans lequel elle est préparée) est injecté dans un muscle d'une patte arrière du rat anesthésié. Des muscles différents peuvent être injectés afin de comparer leur rôle respectif. Cette injection est faite au travers de la peau pour les gros muscles ou après une petite incision de la peau préalablement rasée pour bien identifier les plus petits muscles. L'incision est refermée par une agrafe.

Dans un 2ème temps, l'effet des toxines sur la fonction musculaire est évalué par l'un des 2 modèles suivants :

- Chez le rat éveillé, le modèle du DAS mesure la faiblesse musculaire spontanée de la patte injectée par simple observation et quantification de l'écartement reflex des doigts lorsque l'animal est sorti de sa cage en le tenant sous les pattes.

- Chez le rat anesthésié, le modèle de Force musculaire mesure la force développée par la contraction du groupe des muscles de la patte après stimulation nerveuse (électrodes). Le pied de la patte à mesurer est relié à un capteur grâce à un fil qui transmettra la force développée lors de la stimulation du nerf à un système d'acquisition qui la quantifiera et l'exprimera en grammes. Les 2 pattes de l'animal peuvent être mesurées pour mettre en évidence un effet de la toxine sur la patte opposée alors considéré comme un effet secondaire. L'intérêt est de pouvoir comparer la marge entre la dose induisant un effet du côté injecté et la dose induisant en plus un effet du côté opposé. Cette marge peut varier d'une toxine à l'autre et permet donc de les caractériser et de les comparer.

Afin de limiter les effets négatifs sur l'animal :

- Le nombre de mesures de force musculaire sera de 3 maximum la 1ère semaine puis 2 maximum en cas de longue durée d'action, ceci afin de limiter le nombre d'anesthésie et de stimulations.

- L'anesthésie utilisée est une anesthésie gazeuse par inhalation qui permet un réveil rapide lorsqu'elle est arrêtée. Celle-ci est de 5 min pour l'injection et d'environ 20 min pour la force musculaire durant laquelle le rat est maintenu sous une lampe chauffante pour éviter l'hypothermie.
- Les stimulations sont de quelques secondes
- Les animaux sont hébergés en groupe durant toute l'étude avec un enrichissement de leur milieu de vie
- Les animaux sont pesés tous les jours pendant une semaine, puis 2 fois par semaine si l'étude se prolonge permettant ainsi de compléter la surveillance quotidienne de leur état de santé.
- Afin de limiter la douleur et le stress des animaux, des critères d'exclusion des rats d'une étude sont définis et listés.

Dans ces 2 modèles, sont d'abord testées des toxines de référence auxquelles de nouvelles toxines pourront être comparées.

Le modèle DAS qui est une simple observation permet de travailler avec un plus grand nombre d'animaux que le modèle de force musculaire, ce modèle sera utilisé en 1ère instance pour une caractérisation large des toxines. Des doses pourront être choisies pour être testées dans le modèle de force musculaire.

Des études cinétiques pourront être réalisées sur les mêmes animaux suivis dans le temps diminuant la variabilité inter-animal et la possibilité de comparer l'évolution des différents paramètres mesurés chez le même animal.

Le nombre d'animaux par groupe est de 6 à 8 pour le DAS, ce nombre dépend du paramètre principal étudié (puissance, durée d'action, comparaison de toxine) et de 9 rats/groupes pour la force musculaire. Ces nombres sont basés sur des données bibliographiques sur ces 2 modèles, des données internes et d'experts consultés. Une expérience de DAS comporte au maximum 11 groupes pour une toxine. Pour ce projet l'utilisation de 7446 rats est prévue sur une période de 5 ans.

8298 Les maladies inflammatoires de l'intestin, telles que la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse et la rectocolite hémorragique, sont des maladies complexes et multifactorielles affectant le tractus gastro-intestinal et dont la physiopathologie n'est que partiellement élucidée. Le nombre de patients atteints par ces maladies augmentant, de nombreux traitements ont été mis en place (ex : glucocorticoïdes, immunosuppresseurs). Cependant, ces traitements possèdent d'importants effets secondaires et peuvent aussi se révéler inefficaces chez un grand nombre de patients.

D'autres voies thérapeutiques font donc l'objet de recherches. Il a été montré que l'activité de certaines protéases (enzyme clivant les liaisons peptidiques des protéines) présentes au sein de la muqueuse intestinale augmentait chez les patients et que cette hyperactivité favorisait le maintien de l'inflammation dans la muqueuse. Au vu de ces observations, l'utilisation d'inhibiteurs de protéases (protéines inhibant spécifiquement les protéases) appelés serpins semble être une approche thérapeutique à exploiter.

Certaines serpins bactériennes ont déjà fait l'objet de recherches et se sont révélées avoir un effet anti-inflammatoire in vitro et in vivo. Lors de tests in vivo, les serpins ont été clonées dans la souche *Lactococcus lactis* (comme la serpin humaine élafin antérieurement). Cette souche est fréquemment utilisée dans l'industrie agro-alimentaire pour la production de protéines recombinantes (protéines produites grâce à l'introduction du gène codant pour cette protéine dans une bactérie), pour son faible pouvoir immunogène, et présente une capacité de production intéressante de protéines recombinantes et pour son faible pouvoir immunogène.

Un autre microorganisme, la levure *Yarrowia lipolytica*, est également utilisé dans l'industrie et est présent dans les aliments fermentés. De même, cette levure est inoffensive et est surtout connue pour son potentiel de sécrétion de protéines.

Le but de l'étude est de comparer in vivo l'effet anti-inflammatoire d'une serpin humaine (Elafin) et de trois serpins bactériennes en utilisant deux systèmes de sécrétion : *Lactococcus lactis* et *Yarrowia lipolytica*. Les données obtenues permettront de conclure si la souche *Y. lipolytica* est susceptible de

sécréter in vivo plus efficacement une serpin dans la lumière intestinale (par rapport à la souche *L. lactis*) en vue de futurs traitements chez l'Homme.

Le modèle de colite induite par le Dextran Sulfate de Sodium (DSS) chez la souris reproduit un grand nombre des caractéristiques physiopathologiques des maladies inflammatoires de l'intestin (augmentation de la perméabilité de la muqueuse intestinale, symptômes cliniques tels que le sang dans les selles, etc.). Ceci explique la forte utilisation de ce modèle dans les études sur ces maladies et sa présence au sein du projet.

Durant cette étude, une serpin référence : l'Elafin et trois serpins bactériennes (dont les effets anti-inflammatoire in vivo sont avérés), exprimées par *L. lactis* et *Y. lipolytica*, seront quotidiennement administrées par voie orale aux souris pendant les 7 jours d'administration du DSS via l'eau de boisson (sauf groupes témoins). Un suivi clinique journalier des souris sera effectué jusqu'à l'euthanasie de ces dernières. Il en découlera un score macroscopique permettant de déterminer l'intensité clinique de la pathologie. D'autres analyses effectuées sur le côlon des animaux prélevés après leur euthanasie, ainsi que sur leurs fèces, permettront de quantifier l'inflammation d'un point de vue macroscopique et microscopique.

Utiliser uniquement une approche in vitro pour ce projet exclurait les différentes interactions pouvant survenir au sein de l'hôte (hormones, système immunitaire entre autres); de ce fait le recours aux animaux est indispensable. Le protocole expérimental a été conçu afin de respecter au mieux la règle des 3R : remplacer, réduire et raffiner.

Remplacer : Des tests in vitro ont permis de démontrer le potentiel de production de serpin en utilisant *Y. lipolytica* en comparaison de *L. lactis*. Concernant les serpins utilisées, des tests antérieurs (in vitro et in vivo) font partie des critères qui nous ont permis de les sélectionner pour leur effet anti-inflammatoire, notamment dans le modèle de colite aigüe chez la souris.

Réduire : Le nombre de souris nécessaires a été défini à l'aide d'études précédentes publiées dans la littérature scientifique, mais aussi grâce à un test de puissance afin d'incorporer dans ce projet un nombre minimum d'animaux tout en gardant la possibilité d'obtenir des résultats statistiques significatifs. Pour comparer in vivo l'effet anti-inflammatoire des serpins testées (en utilisant deux systèmes de sécrétion : *Lactococcus lactis* et *Yarrowia lipolytica*), 4 séries composées chacune de 7 groupes de 8 souris, soit au total 224 animaux sont nécessaires.

Raffiner : Les souris seront hébergées par 4 dans des cages collectives. Un enrichissement de leur milieu sera mis en place afin de favoriser le bien-être des animaux et se matérialisera par du papier absorbant à déchiqueter, des buchettes de bois à grignoter, des tunnels en carton pour se cacher et des tiges métalliques pour grimper. La durée d'administration du DSS sera courte (7 jours) afin de limiter le développement des lésions au strict nécessaire pour révéler l'état d'inflammation de l'intestin, fonction de l'efficacité de sécrétion des serpins utilisées.

8299 L'athérosclérose est une maladie inflammatoire chronique et progressive des artères qui reste longtemps asymptomatique mais peut évoluer par poussées brutales — assez peu expliquées — et conduire à des complications comme l'infarctus du myocarde, les accidents vasculaires cérébraux ou la formation et la rupture d'anévrysmes de l'aorte abdominale (AAA). La réponse immunitaire joue un rôle clé dans la formation et la progression des plaques et pourrait être impliquée dans ces épisodes de poussée comme elle le fait lors des réponses de type allergique. Des données épidémiologiques ont montré que les allergies et les anticorps de classe IgE (qui sont délétères dans les allergies) sont un facteur de risque dans l'athérosclérose et les maladies cardio-vasculaires, ce qui suggère un rôle pro-athérogène des IgE. Cette hypothèse est corroborée par des études chez l'animal. Cependant, la démonstration directe du rôle pro-athérogène des IgE, ainsi que les mécanismes par lesquels les IgE exerceraient cette action pro-athérogènes, restent à établir.

Nous allons développer un nouveau modèle de souris transgénique, au phénotype non dommageable, dans lesquels les souris ont des taux anormalement élevés d'IgE dans le sérum, afin de regarder si ces souris développent plus rapidement des lésions, et si la réponse immunitaire locale dans l'aorte est affectée. Des transferts d'IgE de souris malades à des souris saines nous permettront de confirmer que les IgE accélèrent ou non la progression de l'athérosclérose. Répondre à ces

questions pourrait conduire à de nouveaux traitements (ciblant les IgE) visant à diminuer le risque de complications chez les patients athérosclérotiques.

Ce projet est fondé sur la règle des 3R. L'athérogenèse est un processus complexe faisant intervenir de nombreux types cellulaires, et l'étude de l'impact des IgE sur cette maladie ne peut donc se faire que sur des organismes vivants, ayant un système immunitaire proche de l'homme, comme les souris, et rendant le remplacement par des expériences in vitro impossible. Pour l'ensemble des expériences, nous prévoyons d'utiliser 542 animaux, pour une durée de 5 ans. Le fonds génétique des souris est contrôlé et homogène. Les souris contrôles proviennent des mêmes croisements que les souris mutées. Ces deux facteurs vont réduire fortement la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux nécessaires. Enfin, une étude statistique pour le calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisée afin de réduire au minimum le nombre d'animaux et éviter toute souffrance inutile. De plus, dès que possible le même groupe d'animaux contrôle sera utilisé dans le cadre des différents traitements. Enfin, le personnel est très compétent et les animaux sont maintenus sans isolement, avec enrichissement. Les procédures le nécessitant sont réalisées sous anesthésie.

8300 Les maladies d'Alzheimer et de Parkinson représentent des problèmes majeurs de santé publique qui touchent principalement le sujet âgé. Leur étiologie précise reste inconnue, mais inexorablement associée à une mort exacerbée des neurones. Ce sont des maladies à évolution lente, irréversible et à ce jour incurables.

Plusieurs hypothèses concernant les mécanismes moléculaires responsables de la dégénérescence des neurones ont été émises, notamment, l'accumulation de protéines agrégées. L'accumulation de protéines agrégées est donc considérée comme un dysfonctionnement majeur dans les maladies dites neurodégénératives. De manière intéressante l'accumulation de ces amas protéiques responsables de la mort neuronale est liée à une surcharge fonctionnelle du réticulum endoplasmique (RE). Le RE est le compartiment dans lequel les protéines sont repliées et maturées. Lorsque le RE subit un stress cellulaire, il déclenche une réponse visant la réparation du dommage et préservation des cellules. Toutefois, quand le stress est trop important ne permettant pas de réparer le dégât, la cellule va déclencher l'élimination de cellules défectueuses. Au laboratoire nous nous sommes particulièrement intéressés à la contribution de cette réponse cellulaire complexe dans l'étiologie de la Maladie d'Alzheimer et de Parkinson. Notre étude se focalise sur le rôle d'une protéine capable de réguler différents gènes impliqués dans l'homéostasie du RE, nommée XBP1. Par exemple, nous avons démontré que DJ-1 et la parkine (deux protéines responsables de certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson) peuvent réguler et être régulées par XBP1 dans divers modèles cellulaires lors d'un stress du RE. Nous avons démontré aussi par des approches in vitro que le blocage pharmacologique de XBP1 impacte négativement les défenses cellulaires. Ainsi, afin de progresser dans l'élucidation du rôle de la réponse du RE et plus spécifiquement de XBP1 dans l'étiologie de ces pathologies dans un contexte intégré, il est important de transposer ces observations chez l'animal. Afin d'y parvenir nous comptons développer des approches pharmacologiques et de modulation génique afin de créer un modèle préclinique relevant qui nous permettra de valider in vivo des résultats obtenus par des approches cellulaires. La stratégie expérimentale choisie a été utilisée avec succès dans diverses études in vivo associées à d'autres contextes pathologiques.

Les objectifs des trois procédures d'expérimentation chez l'animal sont de 1) mettre au point les conditions d'induction du stress du RE dans le cerveau des souris et déterminer si nos cibles d'intérêt sont modulées par le stress du RE in vivo; 2) déterminer si le blocage pharmacologique de XBP1 impacte la régulation transcriptionnelle des cibles d'intérêt et 3) déterminer si la modulation de XBP1 par une approche génétique impacte spécifiquement la régulation de nos cibles d'intérêt et par conséquent la survie neuronale. Ce projet échelonné sur 5 ans sera réalisé par une personne habilitée et utilisera 538 souris males âgées de trois mois (au maximum) fournies par un fournisseur agréé. Les procédures décrites ci-dessous ont été conceptualisées dans le respect éthique de la règle des 3R (remplacement, réduction et raffinement). Ainsi, l'effectif pour chaque groupe a été réduit au maximum en tenant compte de la variabilité biologique et déterminé à l'aide du programme statistique G*Power. Les protocoles ont été raffinés grâce à l'optimisation des soins, la réduction du temps d'expérimentation, l'utilisation des points limites et méthode d'euthanasie adaptés. Enfin, nous

assurerons le bien-être des animaux tout au long de l'expérimentation en limitant leur stress grâce au suivi des conditions d'hébergement et d'utilisation de cages le proposant un environnement riche.

8301 Les cancers du poumon sont la première cause de mortalité par cancer, chez l'homme, avec plus de 40 000 nouveaux cas par an. Les cancers du poumon ont un mauvais pronostic avec une survie moyenne de 20% à cinq. Il est aujourd'hui bien admis qu'il existe un déficit de la réponse immunitaire dans les cancers, conduisant à l'échappement de la cellule tumorale au contrôle immunologique et à la croissance tumorale. De nombreuses thérapies anti-cancéreuses envisagent donc de stimuler la réponse immunitaire naturelle pour permettre d'éradiquer la tumeur. C'est notamment le cas des vaccins anti-cancéreux.

En effet, les cellules tumorales accumulent souvent des anomalies génétiques de l'ADN qui peuvent induire des modifications phénotypiques de la cellule (mutations de protéines normales, expression sur la cellule tumorale de protéines de stress) qui pourraient être reconnues par le système immunitaire. L'administration d'un antigène tumoral spécifique de la tumeur couplé à un adjuvant (= « vaccin ») permet d'augmenter le recrutement des effecteurs naturels de l'immunité dans le microenvironnement tumoral, de diminuer la taille des tumeurs et permettre une meilleure survie, dans des modèles murins de cancer du poumon.

D'autre part le choix de la voie d'administration apparaît primordial pour obtenir une réponse vaccinale efficace. Dans le contexte du cancer du poumon, la voie muqueuse, soit en délivrant le vaccin par le nez ou directement dans le poumon pourraient permettre de potentialiser l'effet vaccinal, comme cela a été démontré chez la souris.

Le but de ce projet est de valider chez le primate non humain de nouveaux candidats vaccins pour les tumeurs pulmonaires, et de déterminer la meilleure voie d'administration.

Le primate non humain (PNH) a été choisi car l'organisation de ses muqueuses pulmonaires est similaire à celle de l'Homme et qu'il permet une administration ciblée/sélective du vaccin dans le poumon ou dans le nez (contrairement à la souris).

Le projet, présenté dans cette saisine est découpée en 8 procédures, afin d'apporter les prérequis techniques et les arguments scientifiques nécessaires pour établir un dossier réglementaire afin de débiter les essais cliniques chez l'Homme.

Les objectifs des études décrites dans cette saisine sont

- 1) De démontrer la capacité des candidats vaccins à induire des lymphocytes T mémoires au site d'intérêt (le poumon) et une réponse immunitaire locale (dans les lavages broncho alvéolaires et les sécrétions nasales) et périphérique (sécrétions vaginales), selon la voie d'administration.
- 2) Déterminer la meilleure voie d'immunisation (intra musculaire, nasale ou pulmonaire).

Le nombre de PNH nécessaire à ce projet est de 50. En effet, 10 animaux sont nécessaires par candidat vaccin et 5 candidats vaccins seront testés sur 5 ans.

Les expériences ont été planifiées afin de répondre à la règle des « 3R » :

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse vaccinale d'un organisme entier et sont insuffisants pour envisager des essais précliniques chez l'Homme.

Réduire : Il ne s'agit en aucun cas de faire des analyses statistiques puisqu'il s'agira de produire des données qualitatives sur un petit nombre d'animaux. 3 à 4 animaux étant le minimum nécessaire pour prendre en compte la variabilité interindividuelle (paramètres respiratoires). Les candidats vaccins seront validés chez le PNH après que leur efficacité ait été démontrée dans un modèle rongeur.

Raffiner : l'immunisation ainsi que les différents prélèvements seront réalisés sous anesthésie générale. Les animaux seront hébergés ensemble en volières (enrichissement social) conformes aux normes en vigueur. Concernant l'enrichissement, les animaux disposent dans leur hébergement, de plateformes surélevées, de tunnels, de jouets. La distribution de l'aliment couvre les besoins journaliers et est complétée par une distribution de friandises (fruits, légumes, pâtes, riz, pop-corn, céréales, graines de tournesol, etc.) deux fois par jour. Les friandises données sont différentes le matin et l'après-midi, et d'un jour à l'autre. Il est possible d'en cacher certaines dans des jouets afin de stimuler la recherche alimentaire des animaux.

8302 Le diabète de type 2 (DT2) est une maladie caractérisée par une hyperglycémie chronique due à un défaut de sécrétion de l'insuline par la cellule β du pancréas et un manque d'effet de l'insuline sur les tissus cibles (muscle squelettique, tissu graisseux, foie). L'obésité est un facteur de risque de développement du DT2. L'enjeu à l'heure actuelle est de développer des traitements ciblant les stades les plus en amont du DT2 pour préserver au mieux la sécrétion d'insuline par la cellule β pancréatique. L'état pré-diabétique dans l'obésité est associé à la présence d'anomalies d'une protéine appelée nNOS au niveau du pancréas et du muscle squelettique.

L'objectif de ce projet est donc d'éclaircir le rôle *in vivo* de la nNOS dans la sécrétion d'insuline et la sensibilité du muscle à l'insuline en utilisant deux lignées de souris génétiquement modifiées pour présenter soit une inactivation globale du gène de la nNOS dans tout l'organisme (souris nNOS^{-/-}) soit une inactivation restreinte du gène uniquement au niveau pancréatique (souris β nNOS^{-/-}). Ces deux lignées de souris transgéniques sont viables mais peuvent avoir comme phénotype dommageable un problème gastro-intestinal lié à une sténose du pylore qui nécessite l'utilisation d'une nourriture liquide et une surveillance quotidienne de l'état de santé des animaux.

Le métabolisme des souris sera étudié chez les mâles grâce à des procédures *in vivo* non invasives (prise de sang, injection de glucose ou d'insuline) et *in vitro* sur des cultures de cellules issues d'organes prélevés *post portem* chez ces souris. Enfin, afin de déterminer si la protéine nNOS a un effet protecteur ou non sur le développement de l'obésité, les souris mâles seront également étudiées après avoir reçu un régime riche en graisses pendant 12 semaines afin de les rendre obèses. Pour la réalisation de ce projet, nous estimons utiliser 546 souris sur une période de 5 ans. Ce nombre de 546 correspond au nombre de 486 souris mâles et femelles mutantes qui naîtront avec un éventuel phénotype dommageable au cours des croisements pendant 5 ans et parmi lesquelles 60 souris mâles seront utilisées pour les procédures *in vivo*. A ces 486 souris, il faut rajouter le nombre de 60 souris contrôles mâles sans phénotype dommageable issues de cet élevage et qui seront aussi utilisées dans les procédures d'explorations fonctionnelles (486 souris mutantes + 60 souris contrôles=546).

Le projet proposé prend en compte la règle des 3R (Réduction, Remplacement, Raffinement) de la manière suivante :

Réduction : Le nombre de 546 souris estimé pour ce projet a été réduit au minimum pour valider les résultats avec des tests statistiques (test de Student et test ANOVA). Notre laboratoire ayant une forte expertise en expérimentation animale, ce nombre a été défini à partir de données de la littérature mais aussi d'expériences similaires à celles proposées dans ce projet que nous avons déjà réalisées dans nos précédentes études sur des modèles de rat et de souris. De plus chaque souris sera utilisée pour plusieurs procédures (*in vivo* et *in vitro*).

Remplacement : L'utilisation d'un modèle de souris est nécessaire pour mieux comprendre la complexité de l'état d'obésité pré-diabétique dans lequel l'activité de divers tissus métaboliques (tissu adipeux, muscle squelettique, cerveau, etc.) est altérée. Cette compréhension nécessite d'adopter une approche de physiologie intégrée sur l'organisme entier. Or les modèles *in vitro* ne nous permettent pas d'appréhender la complexité des interactions entre les différents tissus métaboliques qui s'établissent au sein de l'organisme et qui dictent les fluctuations du métabolisme et de la masse corporelle.

Raffinement : Afin d'assurer le bien-être des souris, les souris seront placés dans des conditions optimales (température, hygrométrie, cycle jour nuit 12h/12h, enrichissement des cages) au sein d'une animalerie agréée. Les procédures expérimentales utilisées dans ce projet pour étudier le métabolisme sont non invasives, standardisées et validées par la communauté scientifique travaillant dans le domaine du métabolisme, ce qui permet une meilleure comparaison des résultats avec ceux décrits dans la littérature. L'élevage des lignées transgéniques entraînant la naissance de souris mutantes avec un éventuel phénotype dommageable (problème gastro-intestinal), ces animaux recevront une alimentation liquide et seront quotidiennement surveillés y compris le week-end pour s'assurer de leur bonne santé. Si une dégradation de la santé de l'animal est observée, l'animal sera euthanasié.

8303 La transplantation, dernier recours en cas de défaillance d'un organe vital, est une opération lourde. 5746 greffes d'organes ont été effectuées en France en 2015 ce qui représente plus de 15 greffes par jour. Le traitement à base de médicaments immunosuppresseurs permet de diminuer l'intensité des réactions immunologiques de l'organisme contre le greffon mais ces médicaments induisent de nombreux effets secondaires. Dans certains cas, c'est le greffon qui réagit contre l'hôte (Graft versus Host Disease : GvHD). Ainsi, dans les greffes de moelle, les cellules immunologiquement compétentes du donneur réagissent contre les antigènes de l'hôte, aboutissant à des lésions de multiples tissus (peau, tube digestif, foie). Les lymphocytes Treg, capables de contrôler les réponses immunitaires, ont un potentiel clinique majeur dans la prévention du rejet chronique des greffes. Le rôle important des Treg sur la tolérance en transplantation humaine ainsi que dans les modèles rongeurs, a largement été démontré depuis les premiers travaux sur la tolérance infectieuse. L'approche d'une thérapie cellulaire basée sur la génération des cellules Treg modifiées génétiquement (CAR-Treg) permettant un ciblage local de leur activité immuno-régulatrice est une approche thérapeutique innovante, présentant une toxicité potentielle moindre, pourrait apporter une nouvelle approche pour les patients. Au début de l'année 2016, il a été établi dans un modèle xénogénique de GvHD induite par injection de globules blancs humains HLA A2+ chez des souris immunodéficientes que les cellules CAR-Treg humaines dont le récepteur chimérique (CAR) était spécifique de la molécule HLA.A2 étaient plus efficaces que des cellules Treg polyclonales pour réduire l'inflammation liée à la GvHD. Avant de pouvoir administrer chez l'homme, les autorités réglementaires se basent sur un ensemble de données précliniques qui visent à identifier les potentiels risques et à mettre en évidence la preuve d'efficacité de l'approche thérapeutique proposée. Le projet actuel de recherche préclinique s'inscrit dans le développement clinique des CAR-HLA A2-Treg dans le cadre des transplantations. Le projet consiste à évaluer chez la souris NSG le bénéfice thérapeutique des cellules humaines CAR-HLA.A2-Treg dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte induit par des cellules humaines ainsi que de définir la migration, la persistance et le mécanisme d'action de ces cellules dans ce modèle.

Les règles d'expérimentation seront comme suit : (Remplacer) L'emploi des modèles in vivo est nécessaire au projet car il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodes alternatives permettant de reproduire in vitro la complexité du système immunitaire dans le contexte de réaction GvHD lors d'une greffe de cellules hématopoïétiques. Des études préalables in vitro permettront d'identifier les constructions CAR-Treg les plus prometteuses sur la base de nombreux tests fonctionnels in vitro et de phénotypes. (Raffinement) Les souris cohabiteront par groupe de cinq dans un environnement enrichi. Pendant les études, les animaux seront suivis quotidiennement et l'application de points limites adaptés et précoces permettront de limiter au maximum la douleur. Des prélèvements sanguins seront effectués tous les 15 jours pour valider la persistance des cellules humaines injectées chez la souris NSG. Les souris seront euthanasiées à la fin des protocoles selon les méthodes autorisées par la législation afin de prélever les échantillons tissulaires permettant une exploitation maximale par des analyses histologiques des données issues de l'expérimentation chez l'animal. (Réduction) Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés, chaque groupe contiendra le nombre de souris minimum indispensable à l'obtention de résultats statistiquement significatifs. Un nombre total de 1154 souris sera nécessaire.

8304 Ce projet, s'inscrit en continuité d'un autre projet dans lequel nous caractériserons les réponses immunitaires adaptatives de l'hôte lors de l'administration d'anticorps monoclonaux (Ac) par voie pulmonaire, dans le cadre d'infections respiratoires ou de tumeurs pulmonaires.

Dans le contexte de lutte contre certaines pathologies respiratoires (PR), cette immunogénicité peut avoir l'avantage d'induire une réponse humorale spécifique contre l'agent pathogène ou la cellule cancéreuse. Elle permet une protection à long terme quand le pathogène ou les cellules cancéreuses sont réinjectées. Des données préliminaires générées au laboratoire montrent que les Ac administrés par voie pulmonaire induisent une réponse thérapeutique contre les PR, supérieure à celle obtenue après une administration systémique ainsi qu'une réponse humorale spécifique. Ce projet vise à établir une preuve de concept de l'effet vaccinal des anticorps administrés par voie pulmonaire et à caractériser les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de cet effet, dans deux contextes pathologiques différents (infectieux et tumoral).

L'étude de la réponse immunitaire, induite par un anticorps thérapeutique administré par les voies aériennes, sera réalisée dans un modèle infectieux. Dans un second temps, nous élargirons ces résultats à un modèle animal représentatif de tumeurs pulmonaires chez l'Homme. Dans le cadre de ce projet, nous nous attacherons à comparer l'administration des anticorps par voie pulmonaire à la voie intraveineuse (IV). Nous pourrions ainsi évaluer la supériorité de la voie pulmonaire dans la mise en place d'un effet de type vaccinal, par les Ac, et dans la lutte contre les PRs. Le projet fait intervenir 4 procédures et un total de 5700 animaux sur 5 ans.

Afin de respecter la Règle des 3R :

Raffiner : les souris seront élevées en communauté dans des cages comprenant des éléments d'enrichissement (papier absorbant et des fragments de boîtes à œuf). L'ensemble des procédures sera réalisé de manière à limiter la souffrance des animaux (anesthésie, point limite).

Remplacer : les modèles in vitro ne permettent pas de modéliser la complexité de la réponse thérapeutique et immunitaire d'un organisme entier, face à une tumeur ou une bactérie administrée par la voie pulmonaire et sont insuffisants pour envisager des essais cliniques chez l'Homme. Les modèles murins d'infection à PsA ou de tumeurs pulmonaires (B16-F10) sont très bien décrits dans la littérature et permettent de mimer les phénomènes observés chez l'Homme. Les outils transgéniques, permettant une meilleure compréhension des mécanismes immunitaires mis en jeu dans l'effet vaccinal induit par les Ac, sont disponibles chez la souris.

Réduire : Les modèles murins d'infection à PsA ou de tumeurs pulmonaires B16-F10 sont maîtrisés par l'équipe et le porteur de ce projet, ce qui permet de limiter les étapes de mises au point. De plus, les expériences sont organisées dans un ordre précis, avec des témoins choisis de sorte à limiter la répétition d'expériences. La souris est le modèle le plus adapté pour ces études précliniques car nous pouvons étudier la mécanistique de l'effet vaccinal induit par les Ac délivrés par voie pulmonaire en comparant des souris WT et des souris transgéniques pour les cibles immunitaires mises en jeu dans l'effet recherché.

8305 Le psoriasis est une maladie chronique, inflammatoire touchant 1 à 2% de la population mondiale. Cette pathologie entraîne des inflammations cutanées importantes caractérisées par des plaques érythémato-squameuses et évolue par des phases de poussées et de rémissions. Les traitements actuels peuvent permettre une rémission chez une minorité des patients alors qu'ils sont transitoirement efficaces voir inefficaces chez d'autres patients. Les causes sont inconnues ; facteurs génétiques, facteurs environnementaux (fumer augmente le risque de développer un psoriasis). Le TNF alpha est une molécule favorisant le psoriasis et l'un des traitements actuels, les anti-TNF, vise à le neutraliser.

Le but de notre projet est de mieux comprendre les effets néfastes du TNF alpha dans le développement du psoriasis, et de comprendre pourquoi les traitements anti-TNF sont inefficaces chez certains patients. Il nous faudra pour cela étudier le rôle des récepteurs du TNF alpha.

Les mécanismes que nous souhaitons étudier demandent d'avoir un système immunitaire complet et proche de celui de l'homme. L'utilisation de la souris est donc indispensable dans cette étude. Afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, plusieurs organes (rate, sang, ganglions et peau) seront prélevés sur chaque souris au moment de l'euthanasie et plusieurs analyses seront effectuées sur chaque organe. Deux groupes composés de 15 individus chacun seront suffisants pour obtenir des résultats significatifs. Tout au long de l'expérience, les souris seront pesées quotidiennement et leur comportement sera surveillé afin de veiller à leur bien être quotidien. Ces dispositions nous permettront d'être en accord avec la règle des 3R.

8306 La fécondation in vitro est une technique de procréation ex vivo « médicalement assistée ». Cette technique permet d'obtenir in vitro des embryons de souris après fusion de gamètes mâles (spermatozoïde) et femelles (ovocyte). Les embryons obtenus (stade 8 cellules) pourront être réimplantés chez une femelle pseudo gestante afin d'obtenir des individus viables provenant de cette fécondation.

La fécondation in vitro chez la souris est une technique couramment utilisée en laboratoire et à de nombreuses applications expérimentales chez la souris : transgénèse, cryo-préservation des

gamètes ou des embryons (préservation de lignées de souris), éradication de maladies d'animaux d'élevage, étude de mécanismes inhérents aux premières étapes de développement embryonnaires, etc.

Dans le cadre de Travaux Pratiques (TP) de notre Master de Biologie Cellulaire et Physiologie, la réalisation d'une fécondation in vitro chez la souris est proposée aux étudiants.

Le but de ces travaux pratiques est de réaliser une fécondation in vitro afin d'observer en microscopie les étapes qui caractérisent la fécondation in vitro.

La réalisation de la fécondation in vitro nécessite au préalable la ponction des gamètes femelles, les ovocytes, stockés dans la chambre ovarienne après hyperstimulation ovarienne d'une souris femelle pré-pubère.

L'hyperstimulation ovarienne consiste à la double injection intrapéritonéale de gonadotrophines à 48 heures et 12 heures avant ponction des ovocytes. L'hyperstimulation ovarienne et l'euthanasie par dislocation cervicale seront réalisées par des enseignants expérimentés.

Seule la ponction des ovocytes sur animal euthanasié peu avant le TP sera réalisée par les étudiants.

20-25 étudiants sont inscrits à ce TP (répartis en 2 groupes de 10-13 étudiants). 10 femelles seront hyper-stimulées pour un groupe de TP. Ainsi pour la mise en pratique de ce TP, 20 femelles sont utilisées par an, soit 100 femelles au total pour 5 ans.

Dans cette étude à visée pédagogique, il n'existe pas d'autres moyens, que le modèle murin pour réaliser une fécondation in vitro qui s'approcherait de ce qui est observé chez l'Homme.

Nous utiliserons le minimum de souris nécessaire (raffinement des procédures et amélioration de leur environnement).

8307 Le but des expériences est d'étudier l'effet d'une substance des endocannabinoïdes sur le tremblement. De nombreuses pathologies du système nerveux, telles que la sclérose en plaques, sont caractérisées par des tremblements intenses. La maladie affecte 10% de la population de plus de 60 ans et se caractérise par des mouvements involontaires avec une fréquence d'environ 10 Hz. Ces tremblements représentent un handicap majeur. Il est important de comprendre leurs mécanismes sous-jacents afin de pouvoir développer des traitements visant à les réduire.

Les expériences permettront de déterminer comment un analogue des endocannabinoïdes (une substance naturellement produite par les neurones) peut réduire des tremblements induits pharmacologiquement chez la souris. L'implication des astrocytes de la moelle épinière sera testée de façon spécifique.

Le tremblement est un phénomène complexe qui implique à la fois les muscles et le système nerveux. Il sera donc nécessaire de faire les expériences sur des animaux vivants pour lesquels le tremblement sera induit par injection d'harmaline. Cette molécule induit des tremblements (8-12 Hz) semblables à ceux observés chez les patients.

Nous avons pour objectif d'utiliser le moins d'animaux possible (80). Pour cette raison, le plus grand nombre de paramètres sera mesuré sur chaque animal. Afin de minimiser leurs souffrances, les souris seront euthanasiées à la fin de l'expérience.

Il est essentiel d'utiliser des souris car nous voulons étudier des mécanismes et circuits neuronaux conservés chez les mammifères y compris l'homme. Ainsi, l'usage des invertébrés qui ont un système nerveux complètement différent serait inapproprié.

D'un point de vue méthodologique, nous nous engageons à respecter la règle des 3R (remplacement, réduction, raffinement) :

Remplacement : Les méthodes alternatives (cultures cellulaires in vitro, modélisation in silico) fournissent des informations trop limitées et ne peuvent reproduire toute la complexité d'un organisme vivant.

Réduction : Les animaux utilisés dans chacun des groupes expérimentaux n'excèdera pas 10 animaux c'est à dire le nombre minimal d'échantillon permettant l'application de tests statistiques classiques dans le domaine. Les nombres avancés permettent de garantir une bonne interprétation

des résultats. Néanmoins, si l'expérience nous montre que les échantillons peuvent être réduits, ces nombres seront réduits en conséquence.

Raffinement : Les animaux sont observés quotidiennement par un personnel qualifié afin que des mesures soient prises rapidement si des signes délétères apparaissent. Le milieu d'élevage est enrichi (matériel de nidation).

8308 La dystrophie musculaire de Duchenne (DMD), maladie musculaire héréditaire et fatale la plus fréquente chez l'enfant, est causée par des mutations dans le gène codant pour la dystrophine.

La recherche sur le rôle de la dystrophine pendant la régénération musculaire est entravée par le manque d'un modèle animal permettant l'imagerie in vivo de la dystrophine. Une lignée murine rapportrice DmdEGFP a été créée récemment. Elle exprime de manière endogène la protéine dystrophine normale fusionnée à la protéine fluorescente EGFP et permet ainsi la visualisation de la dystrophine par imagerie de fluorescence.

Dans ce projet, nous utiliserons cette nouvelle lignée murine pour étudier le rôle de la dystrophine pendant la régénération musculaire in vivo afin de mieux comprendre la fonction des cellules souches musculaires in vivo et la dynamique de la dystrophine suite à une lésion musculaire aiguë.

Cette lignée murine DmdEGFP a aussi été croisée avec des souris mdx (modèle murin de la pathologie DMD, ayant une mutation sur l'exon 23 du gène de la dystrophine). Un premier modèle murin dystrophique rapporteur dénommé DmdEGFP-mdx, a été généré.

Nous allons utiliser cette lignée DmdEGFP-mdx pour étudier in vivo l'efficacité d'une des approches thérapeutiques actuelles les plus prometteuses pour DMD : l'utilisation d'oligonucléotides antisens tricyclo-ADN pour le saut de l'exon 23 du gène de la dystrophine, qui a été récemment développée. Cette preuve de concept in vivo, qui sera établie dans un modèle animal n'ayant jamais été exploré dans d'autres pays, est primordiale pour le traitement de cette pathologie.

Le bénéfice potentiel pour ce projet est donc double : une meilleure compréhension du rôle de la dystrophine dans la régénération musculaire et d'obtenir des données sur des approches thérapeutiques par saut d'exon qui est une des approches les plus prometteuses à l'heure actuelle pour ces maladies incurables. Le saut d'exon permet de faire synthétiser une protéine tronquée mais retenant la plupart de la fonction de la protéine entière, surtout pour la dystrophine qui est une protéine de grande taille.

Les animaux recevront des injections de produits pour induire la régénération musculaire et des lésions modèles, puis des oligonucléotides à potentiel thérapeutique. La contrainte pour eux sera donc liée à ces injections et au suivi en imagerie in vivo. Cependant toutes les procédures seront conduites sur animal anesthésié (inhalation d'isoflurane à 1.5% à 2L/min) et dont les constantes physiologiques seront mesurées en continu afin de détecter tout signe de détresse. Leur température sera stabilisée au moyen d'une ventilation d'air chaud. La douleur liée à la chirurgie sera prise en compte par injection de Lidocaïne et de Buprénorphine. Les animaux seront surveillés après chirurgie jusqu'à leur réveil et de la nourriture gélatinisée et de l'enrichissement type cocoon seront mis à disposition dans les cages afin de faciliter leur récupération.

Nous utiliserons ces deux lignées murines et nous estimons un total de 90 souris nécessaires pendant deux ans. Le nombre de souris par groupe a été optimisé de sorte à obtenir des résultats statistiquement probants tout en minimisant le nombre d'animaux par des procédures d'imagerie permettant la répétabilité des mesures sur un même animal et ainsi être en accord avec les principes de raffinement et de réduction.

8309 Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) est l'agent pathogène responsable du syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA). Le SIDA est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Les traitements antirétroviraux permettent un contrôle efficace de la réplication virale mais ne conduisent pas à l'éradication du virus du fait de l'existence de réservoirs viraux. Les réservoirs viraux sont constitués de cellules infectées où le virus demeure à l'état latent. Ces cellules infectées latentes ne sont pas reconnues par le système immunitaire et ne sont donc pas éliminées car elles n'expriment aucun antigène viral. A tout moment, ces cellules latentes peuvent se réactiver et produire des particules virales dans l'organisme. Les traitements antirétroviraux n'atteignent pas ces cellules

infectées latentes car elles sont localisées dans des compartiments cellulaires ou des sites anatomiques peu ou pas permissifs à une pénétration efficace des molécules antirétrovirales. Les réservoirs viraux constituent ainsi une barrière pour l'éradication du VIH chez les patients infectés chroniquement malgré un traitement antirétroviral prolongé.

Une meilleure compréhension des mécanismes à l'origine de la constitution et de la persistance des réservoirs viraux sous traitement antirétroviral et du contrôle de la réplication virale après arrêt des traitements est aujourd'hui nécessaire pour permettre une amélioration de l'efficacité des traitements et étudier de nouvelles approches thérapeutiques pouvant conduire à une guérison fonctionnelle (absence de progression clinique en l'absence de traitement) ou à l'éradication de l'infection.

Les objectifs de ce projet sont : 1) de mettre en place un modèle animal reproduisant la situation des patients infectés chroniquement et traités sur le long terme pour rechercher et caractériser les réservoirs viraux tissulaires et cellulaires ; 2) d'étudier l'impact du délai d'initiation d'un traitement antirétroviral sur la constitution et la persistance des réservoirs viraux et le contrôle de la réplication virale après arrêt du traitement. Le modèle animal choisi pour ce projet est le primate non humain (PNH). Le modèle d'infection expérimentale du PNH par des souches pathogènes du virus de l'immunodéficience simienne (SIV) est particulièrement adapté pour ces études. Le PNH constitue le seul modèle expérimental reproduisant l'infection par le VIH. L'évolution de l'infection est semblable à celle observée chez l'Homme. Ce modèle est le plus pertinent pour obtenir des résultats prédictifs et transposables à l'Homme.

Le projet prévoit d'utiliser au maximum 104 animaux nés et élevés dans des élevages agréés. Le nombre d'animaux dans chacun des groupes expérimentaux a été 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 (inoculation virale, 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 par paires 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.

8310 Toute atteinte à un organe (blessure, infection) induit une réponse physiologique de réparation tissulaire dont le but est la cicatrisation rapide et la régénération fonctionnelle de l'organe. Ce processus joue un rôle essentiel dans notre organisme. La dérégulation de ces mécanismes est impliquée dans la pathogénèse de nombreuses maladies chroniques inflammatoires et fibrotiques (qui peuvent affecter différents organes y compris le muscle squelettique ou cardiaque, le foie, le poumon, le rein et la peau).

Les pathologies fibrotiques sont la conséquence d'une inflammation chronique et d'une accumulation excessive de matrice extracellulaire dans le parenchyme d'un organe. Initialement bénéfique, la réponse inflammatoire et l'excès de matrice extracellulaire peuvent à long terme aboutir à des lésions permanentes et parfois mortelles. Les mécanismes régulant le processus de réparation tissulaire et la fibrose ne sont qu'incomplètement élucidés, et il n'existe pas à ce jour de traitement spécifique et efficace permettant le retour à un parenchyme normal et fonctionnel une fois que le processus fibrotique est activé.

Des progéniteurs de cellules profibrotiques peuvent être identifiés par expression de la protéase ADAM12. L'objectif de ce projet est de déterminer le rôle de ces cellules dans les maladies chroniques inflammatoires et fibrotiques. En particulier ce projet vise à comprendre comment les cellules exprimant la protéase ADAM12 affectent le remodelage tissulaire, l'inflammation et la fibrose qui en découle. A moyen terme, ce projet vise à identifier des nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des maladies inflammatoires et fibrotiques.

Le développement de ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique n'a pas été ou a été génétiquement altéré. La complexité du développement des pathologies fibrotiques ne permet pas une approche expérimentale de remplacement in vitro. La souris est un bon modèle pour étudier ces questions car de nombreux outils génétiques existent.

Cependant le nombre de souris utilisée a été réduit au maximum. Pour les sept procédures qui seront mises en œuvre pour explorer et caractériser le rôle des cellules ADAM12+ dans la fibrose, nous estimons à 2776 (sur 5 ans), l'effectif de la population de différentes lignées de souris en expérimentation, ce, en nous limitant aux seules expériences considérées comme indispensable et en limitant les répétitions inutiles. Nous utiliserons des souris mâles et femelles qui ont entre 4 semaines et 30 semaines. Par ailleurs, nous donnerons la préférence à des procédures non invasives lorsque c'est possible et aurons recours aux soins/analgésie nécessaires pour limiter la douleur. Les niveaux de sévérité attendus vont de modéré à sévère, cependant toutes les précautions seront prises pour limiter leur inconfort et souffrance potentielle qui peut en découler.

8311 Les troubles anxieux sont particulièrement fréquents dans les pays industrialisés. Ainsi, il est estimé que 13 à 22% des habitants de ces pays développeront une pathologie anxieuse au cours de leur vie. Par ailleurs, les états anxieux sont impliqués dans l'apparition de pathologies d'ordre psychiatrique avec, au-delà de l'aspect individuel, un coût important pour la société. Par exemple, le trouble de l'adaptation avec anxiété est à l'origine d'environ 9% des consultations de médecine générale pour motif psychologique en France. L'évaluation de l'efficacité de nouveaux composés pour traitement de l'anxiété nécessite d'observer le comportement animal dans des conditions adéquates.

Le test de la boîte clair-obscur est l'un des modèles d'évaluation de l'anxiété les plus utilisés chez la Souris. Il présente l'avantage majeur d'être sensible à de nombreux types de molécules utilisées en clinique humaine. Sa sensibilité aux molécules pharmacologiques telle que la Buspirone en plus des anxiolytiques plus classiques comme les benzodiazépines, rend ce modèle très pertinent pour l'évaluation des effets anxiolytiques des molécules en cours de développement. L'utilisation d'animaux est nécessaire pour étudier les effets anxiolytiques de nouveaux produits car il n'existe pas de méthode alternative (tests in vitro ou in silico) (remplacement).

Ce test est basé sur l'aversion naturelle des rongeurs pour la lumière.

Le dispositif expérimental est composé de 2 compartiments juxtaposés, le compartiment clair aux parois blanches qui est ouvert, et le compartiment sombre aux parois noires qui est fermé. Une ouverture dans la cloison centrale permet le passage de l'animal d'un compartiment à l'autre. Au cours du test l'animal peut explorer librement le dispositif pendant 5 minutes. Dans cette situation, le compartiment clair induit un état d'anxiété plus important pour l'animal que le compartiment sombre, on dit qu'il est plus anxiogène. Le niveau d'anxiété sera évalué par la comparaison entre le temps passé dans chacun des compartiments, le nombre de transitions entre les compartiments ainsi que la distance parcourue. Ainsi par exemple plus un animal sera anxieux plus il passera de temps dans le compartiment sombre ; en revanche l'administration d'un traitement anxiolytique devrait permettre aux animaux de diminuer le temps passé dans le comportement sombre au profit du compartiment clair.

L'objectif de ce projet est de tester l'efficacité anxiolytique de produits fournis par nos clients. Ce projet portera sur 3 ans, au cours desquels, nous testerons au maximum 80 Composés-Doses ; nous testerons ainsi un composé à une dose par groupe expérimental. Nous reproduirons le schéma expérimental ci-dessous au maximum 20 fois sur la période de 3 ans.

Un lot expérimental sera composé de 6 groupes expérimentaux, comprenant chacun 12 animaux comme suit :

Groupe 1 : Véhicule

Groupe 2 : Anxiolytique de référence (Diazépam ou Buspirone)

Groupe 3 : Composé-Dose 1

Groupe 4 : Composé-Dose 2

Groupe 5 : Composé-Dose 3

Groupe 6 : Composé-Dose 4

Ce projet nécessitera un maximum de 1440 souris, de souche C57BL/6J, CD-1 IGS ou Balb/c et âgées de 3 semaines à réception.

Les produits seront administrés par voie orale.

Pour un lot expérimental, les 72 souris seront prétraitées par voie orale pendant 3 jours avant la réalisation du test et traités le jour du test avec le véhicule des composés-dose, la référence pharmacologique (Diazépam ou Buspirone) ou les composés-dose une heure avant leur passage dans le test de la boîte clair-obscur. Les animaux seront placés à jeun pour la réalisation du test. Le test de la boîte clair-obscur sera effectué pendant 5 minutes pour chaque souris comme décrit précédemment.

Les animaux seront hébergés à 2 par cage avec un enrichissement du milieu (feuille de papier absorbant). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera l'euthanasie des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement).

A la fin des expérimentations, les animaux seront euthanasiés si une réutilisation ne peut être envisagée.

8312 La toxoplasmose est une infection asymptomatique chez les personnes immunocompétentes qui conduit, néanmoins à la formation de kystes cérébraux hébergeant des formes latentes du parasite appelés des « bradyzoïtes ». Cette infection chronique peut engendrer une pathologie particulièrement grave chez les patients immunodéprimés (SIDA, transplantés) due à la réactivation des bradyzoïtes contenus dans les kystes cérébraux. Également, la primo-infection chez la femme enceinte, peut entraîner des lésions plus ou moins sévères chez le fœtus en développement, lors d'une infection aiguë. Nos projets de recherche s'inscrivent dans la compréhension de deux fonctions essentielles au parasite responsable de la toxoplasmose, (*Toxoplasma gondii*), qui sont l'invasion et la survie à l'intérieur de la cellule hôte. Nos travaux ont permis d'identifier un grand nombre de gènes parasitaires indispensables pour ces étapes et de poser les bases du développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour le traitement de la toxoplasmose.

Jusqu'alors, nous utilisions des techniques de cultures cellulaires qui suffisaient pour un grand nombre de nos investigations. Cependant, aucune technique in vitro ne permet de remplacer l'utilisation des animaux pour étudier le développement et la réactivation de l'infection chronique (kystes cérébraux). En effet des nombreux facteurs liés au statut immunitaire de l'hôte sont impliqués dans le maintien de l'infection et sont impossibles de reproduire dans des modèles de culture cellulaire. Dans le cycle de vie du parasite, la souris est un hôte intermédiaire naturel, chez qui la physiopathologie de la toxoplasmose aiguë et chronique est très similaire à celle de l'homme. Nous utiliserons des protocoles déjà standardisés chez la souris, afin d'évaluer la virulence des parasites mutants obtenus dans notre laboratoire lors de 1) la phase aiguë de la toxoplasmose, 2) la phase chronique (formation de kystes), 3) la réactivation des kystes chez l'immunodéprimé, et enfin 4) le potentiel vaccinal de parasites mutants complètement atténués dans leur virulence. Tous les mutants parasitaires testés seront préalablement validés en culture cellulaire. Ces expériences sont nécessaires pour mettre à jour de nouvelles stratégies vaccinales efficaces contre ce parasite très répandu et définir des cibles thérapeutiques potentielles de la phase aiguë et/ou la phase chronique de la maladie.

Pour l'ensemble du projet sur 5 années, 1700 souris et 30 rats seront utilisées.

L'application de la règle des trois R sera soigneusement respectée afin de garantir le bien-être animal lors des procédures expérimentales. De même que le nombre d'animaux utilisés sera réduit au minimum, des mesures de réduction, remplacement et de raffinement seront menées en permanence comme il suit :

- Le recours à l'utilisation d'animaux sera limité aux seules questions biologiques qui ne peuvent être adressées par des techniques de culture cellulaire (remplacement).
- Les mêmes animaux seront utilisés pour la réactivation d'une infection aiguë après une phase chronique (réduction).
- Les animaux ayant survécu à l'infection aiguë seront utilisés pour les essais de vaccination (réduction).

- Lors de l'euthanasie, les animaux seront sous anesthésie (isoflurane 2%) et les organes non requis pour l'expérience en cours, seront conservés pour d'autres utilisations, évitant la répétition d'expériences et l'utilisation d'autres animaux, le cas échéant (réduction, raffinement).
- Les méthodes d'analyses utilisées seront les plus avancées, afin d'obtenir des mesures précises réduisant la variabilité expérimentale et donc le nombre d'animaux utilisés (réduction, raffinement).
- Les animaux bénéficieront des soins de qualité administrés par du personnel qualifié conformément aux bonnes pratiques en donnant priorité au respect de l'animal (raffinement).
- Un suivi journalier des animaux sera mis en place sur feuille d'observation afin de contrôler l'apparition des signes de souffrance grâce à des points limites établis préalablement (raffinement).
- La cellule de bien-être animal de l'établissement participera au suivi rapproché des animaux afin de contribuer à réduire la douleur et la souffrance (raffinement).
- Les animaux seront hébergés dans un environnement de vie enrichi avec du matériel de nidification et une attention particulière sera donnée au caractère social de vie en groupe pour réduire l'angoisse des animaux (groupe de 5 maximum par cage) (raffinement).
- Les animaux seront hébergés dans des cages de portoirs ventilés, avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum dans une pièce qui leur est réservée (raffinement).
- Les animaux auront au minimum une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute (raffinement).

8313 Chaque sportif est soumis à des règles strictes concernant la prise de médicaments lors d'une compétition.

Dans le milieu équestre, les chevaux sont considérés comme des sportifs à part entière et sont soumis au même type de contrôle de résidus de médicaments et/ou de produits dopants dans les urines et dans le plasma.

Cela a pour but de protéger l'animal et de réduire l'utilisation de produits qui pourraient masquer par exemple une douleur ou un inconfort de l'animal lors de la compétition.

Le projet a pour objectif de déterminer la durée maximale pendant laquelle il est possible de retrouver ces substances et leurs métabolites dans le sang et les urines du cheval. Cela permettra de compléter les données pharmacocinétiques sur ces produits dopants et /ou médicaments et ainsi mettre en place des règles concernant leur utilisation avant une compétition.

Le bénéfice de cette étude sera alors de permettre de mieux préserver les chevaux lors des compétitions et de mieux surveiller l'utilisation de produits dopants pouvant conduire à des blessures graves voire irréversibles pour le cheval. Le risque pour les chevaux utilisés lors de ce projet sera limité car les produits utilisés le seront conformément à l'utilisation qui peut en être faite en médecine vétérinaire sur cette espèce et toujours sous contrôle vétérinaire.

L'étude sera menée sur le cheval car c'est l'espèce cible pour laquelle ces substances sont utilisées. Le recours à l'animal est nécessaire car le devenir d'un médicament dans un organisme (pharmacocinétique) n'est pas prévisible par des études in vitro compte-tenu de la complexité des mécanismes (absorption à travers les entérocytes, métabolisme hépatique, diffusion tissulaire, élimination rénale, etc.).

Les chevaux décrits dans ce projet sont des chevaux utilisés au moins une fois par semaine dans des reprises de tous niveaux au sein d'un centre équestre ce qui permet d'avoir des chevaux habitués au contact humain, manipulés quotidiennement, avec un suivi régulier de leur état général par un vétérinaire. Ils vivent au pré en groupes constitués selon leurs affinités et ne seront placés en boxes que ponctuellement pour les administrations et les recueils de sang et urines.

Pour chaque essai (un essai = une substance testée), une étude pilote sera réalisée sur deux chevaux afin de bien déterminer les temps de prélèvement du plasma et des urines, de réduire la durée d'expérimentation sur les chevaux de l'étude principale et donc diminuer le nombre de prélèvements.

Ce pilote permettra également de réduire le nombre d'animaux utilisés dans l'étude principale grâce à l'optimisation des temps de prélèvements.

L'étude pilote sera ensuite complétée par une étude principale sur 6 chevaux, nombre suffisant pour déterminer les paramètres pharmacocinétiques de la substance en tenant compte de l'éventuelle variabilité interindividuelle.

Tous les essais seront menés sur le même lot de 8 chevaux. Il n'y aura au maximum qu'un essai par année. Un examen clinique sera réalisé par un vétérinaire à la fin de chaque essai et avant le commencement de chaque nouvel essai afin de confirmer que les chevaux auront pleinement retrouvé leur état de santé et de bien-être général.

8314 Ce projet a pour objectif d'étudier la réhabilitation post opératoire ainsi que la faisabilité technique d'une cholécystectomie par laparoscopie suite à la formation d'une fistule cholécysto-duodénale à l'aide d'un stent dans le traitement de la cholécystite aiguë.

D'une façon générale, la cholécystite aiguë est efficacement traitée par des antibiotiques associés à une cholécystectomie.

Dans le cas des patients présentant des comorbidités sévères, le traitement peut d'abord être une cholécystotomie percutanée suivie d'une ablation chirurgicale de la vésicule biliaire à un stade ultérieur. Alors que la plupart des patients peuvent bénéficier d'une cholécystectomie une fois le stade aigu de l'infection passé, certains patients ne sont pas éligibles pour une intervention chirurgicale, soit en raison de comorbidités, soit par choix.

Il a été démontré que l'arrêt du drainage percutané sans cholécystectomie consécutive était associé à un taux élevé de cholécystite récidivante conduisant souvent à des issues graves. D'autre part, le drainage percutané continu présente plusieurs inconvénients : 1. risque d'infection, 2. risque de dislocation du drain ou d'enlèvement accidentel, 3. nécessité d'une observation médicale continue, 4. d'épuisement de la vésicule biliaire et 5. inconfort du patient.

Plusieurs techniques de drainage de la vésicule biliaire en plus de la cholécystotomie percutanée ont été décrites dans la littérature.

La mise en place d'un stent transpapillaire guidé par ultrasons endoscopiques (EUS) peut être efficace, mais est techniquement difficile et limitée aux stents en plastique de petit calibre (5 à 7 French), qui sont enclins à l'occlusion.

Le placement percutané d'une endoprothèse cholécystoduodénale est probablement plus facile d'un point de vue technique qu'une approche endoscopique, mais encore une fois l'endoprothèse sera de petit calibre.

Le drainage transcutané guidé par EUS a également été décrit et si cela permet l'extraction des calculs présent dans la vésicule biliaire, il est techniquement difficile et réservé aux centres experts.

Il a été démontré en clinique qu'une fistule cholécystoduodénale chronique préexistante après une cholécystite aiguë pouvait être élargie par l'implantation percutanée d'une endoprothèse auto-expansible. Ensuite, en utilisant ce trajet, il est possible de vider les calculs biliaires existants dans le duodénum avec un bon résultat clinique et une perméabilité à long terme du trajet. A notre connaissance, il n'y a pas d'autres études sur la création de fistules cholécysto-duodénales percutanées chez l'homme, et leur impact sur la réalisation d'une cholécystectomie par laparoscopie par la suite.

Dans une étude préliminaire sans survie sur 10 (dix) porcs, nous avons pu montrer que l'implantation percutanée d'une endoprothèse (stent Axios) pour la création d'une communication entre la vésicule biliaire et l'intestin est techniquement faisable, efficace et sûre.

Le but de cette nouvelle étude sur les animaux est de démontrer la sécurité et l'efficacité de cette nouvelle technique de drainage percutané de la vésicule biliaire, ainsi que la possibilité de pratiquer une cholécystectomie par laparoscopie suite à la création de la fistule.

Ce projet respecte le principe des 3R :

Remplacement :

Le recours à l'animal est nécessaire pour évaluer l'efficacité de l'utilisation du stent Axios pour la création d'une fistule cholécysto-duodénale, afin de pouvoir envisager par la suite la mise en place d'essai clinique chez l'homme. Cette étude comprend une évaluation des complications et de la réhabilitation post opératoire. C'est pourquoi cette étude ne peut se faire in vitro ou sur pièce cadavérique, et nécessite le recours à l'animal vivant.

Réduction :

Cette étude préclinique est préliminaire et permet d'évaluer la réhabilitation post opératoire suite à l'utilisation des stents Axios pour la création d'une fistule cholécysto-duodénale. Selon notre expérience, nous avons estimé que 10 cochons sont nécessaires pour étudier de façon robuste la réhabilitation post opératoire de cette chirurgie. Suite à cette étude, une application chez l'humain pourra être envisagée.

Raffinement :

Le projet prévoit des procédures réalisées sous anesthésie générale conventionnelle avec contrôle de la douleur per opératoire et post opératoire. Le projet prévoit des procédures mini-invasives engendrant des douleurs post opératoires modérées. En ce sens, les animaux recevront un protocole de soins post opératoires comprenant une évaluation clinique quotidienne, des antidouleurs, des anti-inflammatoires et un régime standardisé. Des critères d'arrêt anticipé de l'expérimentation en cas de survenue d'une complication ont été identifiés

8315 La question de la satisfaction des besoins en acides aminés est une question majeure chez l'homme. 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 indispensables (AAI) peuvent être sub-limitants dans ce type de régimes. Les conséquences en acides aminés indispensables provoquent un retard de croissance et une sensibilité accrue aux infections.

Ce projet a pour objectif d'étudier, chez le rat, la sensibilité des tissus et organes et de rechercher des biomarqueurs en réponse (1) à la déficience en protéines, (2) à la déficience en acides aminés indispensables. Le rat est un modèle couramment utilisé dans les études de nutrition. De plus, notre laboratoire utilise fréquemment des rats pour les études nutritionnelles, si bien que nous en avons une bonne connaissance pratique et nous disposons du matériel performant nécessaire à l'étude du métabolisme et du comportement pour ce rongeur. Le choix du rat se justifie également par la nécessité de prélever certains organes, comme l'hypothalamus, et le volume sanguin nécessaire à la réalisation des dosages biochimiques, hormonaux et pour la recherche de biomarqueurs. Pour la première partie du projet, 48 rats âgés de 3 semaines seront répartis en 6 lots (8 animaux par lot) alimentés avec un régime contenant 6 niveaux de protéines durant 21 jours. L'alimentation sera distribuée en deux repas : un repas calibré entre 12h et 12h30 et un accès libre à la nourriture de 12h30 à 9h le lendemain. Nous comparerons la prise alimentaire des différents groupes.

Durant la 2ème semaine d'expérimentation, les rats seront placés le soir à 18h, en cages métaboliques pendant 48 heures afin de collecter les urines sur 24h pour rechercher les biomarqueurs moléculaires spécifiques de la déficience. Durant la 3ème semaine, les rats seront placés en cage calorimétrique pour la mesure des échanges respiratoires, de l'activité motrice et la collecte des gaz expirés pour la mesure des profils métaboliques. Un repas test sera également réalisé et des prises de sang seront effectuées afin de mesurer les variations des paramètres plasmatiques (glycémie, insulïnémie ...).

A la fin de l'expérimentation, les animaux seront euthanasiés et la composition corporelle sera étudiée. Une injection de valine ¹³C sera réalisée 20 minutes avant l'euthanasie, dans le but de mesurer la synthèse protéique. Le foie, le pancréas, l'intestin, le muscle, les os, les reins et l'hypothalamus seront prélevés.

La deuxième partie du projet étudiera l'effet de la déficience en l'un des 9 acides aminés indispensables. Elle impliquera 9 séries de 48 rats, soit un total de 432 animaux âgés de 3 semaines qui seront alimentés avec le régime contrôle qui couvre les besoins du rat en croissance (déduit des

données de la première expérimentation). Les rats seront répartis en 6 groupes expérimentaux recevant respectivement pendant 21 jours soit le régime contrôlé couvrant tous les besoins en acides aminés, soit un régime couvrant respectivement 10, 30, 50, 75 ou 150% des besoins soit en lysine, soit en un des 8 autres AAI et 100% des besoins pour les autres acides aminés. Les procédures expérimentales seront identiques à celles réalisées pour la première partie du projet.

Ce projet nécessitera l'utilisation d'un total de 480 rats sur 5 ans. Le nombre d'animaux par groupe (8) est le nombre minimal nécessaire pour étudier un processus biologique en tenant compte de la variabilité individuelle. Le nombre de groupe par expérience correspond à une dose réponse pour établir et affiner un seuil d'apport en protéines et en AAI.

Avant chaque début d'expérimentation, les animaux seront adaptés pendant 1 semaine aux conditions de l'animalerie. Durant les 21 jours d'expérimentation, les animaux vivront en cages individuelles transparentes, pour le suivi de leur consommation alimentaire et de l'évolution de leur poids corporel. Pour pallier cet isolement, le milieu sera enrichi au moyen d'objets, tels que des anneaux métalliques adaptés aux rats ou des tunnels ainsi que des billes.

Ces études permettront de définir les organes les plus sensibles à la déficience d'apport en AAI et les biomarqueurs associés selon les différents niveaux de déficience en ces acides aminés. La carence en acide aminés indispensable peut perturber des organes différents selon l'acide aminé considéré et nécessite donc d'étudier les répercussions sur chaque organe. Les objectifs du projet ne peuvent donc être atteints sans recours à l'animal.

De plus, pour l'ensemble des expérimentations, la nécessité de mesurer les conséquences de l'ingestion de régimes à teneur variable en acides aminés 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.

8316 Ce projet s'inscrit dans le cadre du développement de vaccins thérapeutiques anti-cytokines. Les cytokines sont des protéines naturelles qui orchestrent certaines réponses immunitaires et inflammatoires. La surexpression de certaines cytokines a été identifiée comme l'une des causes de l'apparition ou du développement de pathologies auto-immunes, inflammatoires ou cancéreuses. Pour répondre à ces besoins thérapeutiques, notre laboratoire développe des kinoïdes dont le mécanisme d'action repose sur la production par le système immunitaire du patient d'anticorps anti-cytokine, après administration de ce kinoïde. L'administration est réalisée sous forme d'émulsion avec un adjuvant de type huileux; elle induit une réponse naturelle générant des anticorps polyclonaux capables de neutraliser l'activité biologique de la cytokine cible.

A ce jour, le kinoïde ciblant l'IFN-alpha est en cours d'évaluation dans une étude clinique internationale chez des patients atteints de lupus (une maladie auto-immune pouvant affecter de nombreux organes et tissus de l'organisme), et dans une autre étude chez des patients souffrant de dermatomyosite (une maladie caractérisée par l'inflammation de zones de la peau et musculaires).

En appliquant la règle des 3R (Remplacement, Réduction et Raffinement), et afin d'évaluer l'immunogénicité des candidats vaccins (kinoïdes IFN-K, VEGF-K, IL-4-K ou IL-13-K), c'est-à-dire leur capacité à induire une réponse immune avec production d'anticorps polyclonaux ciblant la cytokine d'intérêt, les candidats vaccins seront testés sur des souris consanguines (Balb/cByJ, ou C57BL/6 ou autres lignées couramment employées). L'effet du mode d'administration des kinoïdes sera étudié dans ce projet, afin de comparer si une administration par voie intramusculaire ou sous-cutanée entraîne une différence d'immunogénicité. Ce projet permettra également d'étudier les variations éventuelles d'immunogénicité dues à un changement d'adjuvant.

L'évaluation de la stimulation d'un système immunitaire due à des injections de vaccins (réponse humorale) ne peut se faire que sur des animaux vivants, aucun modèle cellulaire ne peut à ce jour mimer cette réponse.

En accord avec les exigences de réduction et de raffinement, le nombre d'animaux par groupe sera limité, afin de conférer une puissance statistique suffisante pour ce protocole expérimental. Nous utiliserons 10 souris par groupe, chaque groupe combinant un kinoïde testé et une voie d'administration.

En prévoyant des études avec 8 groupes d'animaux chacun, un total de 80 animaux par an seront utilisés (donc 400 animaux au maximum pour une durée totale du projet de 5 ans).

Le suivi du comportement des animaux est réalisé quotidiennement afin de s'assurer de leur bien-être. Les points limites sont évalués de manière à éviter toute détresse ou souffrance des animaux inclus dans le protocole. Cela inclut notamment un suivi quotidien de l'aspect des animaux (poil, comportement) et un suivi régulier de leur poids, de façon à détecter une éventuelle perte de poids.

8317 Le cœur est un muscle qui se contracte en rythme pendant toute la durée de notre existence. Chaque battement est stimulé par un signal électrique qui est généré par le système de conduction du cœur. Un rythme cardiaque normal comprend 60 à 100 battements par minute.

Au cours d'un battement normal, le signal électrique cardiaque suit un chemin spécifique à travers le cœur. Le signal prend sa source dans le nœud sino-auriculaire (nœud SA ou nœud sinusal), situé dans l'oreillette droite. Le nœud sinusal ordonne aux oreillettes de se contracter, ce qui a pour conséquences d'entraîner le sang vers les ventricules. Le signal électrique circule ensuite à travers le nœud auriculo-ventriculaire (nœud AV) et poursuit sa route dans les ventricules. Il leur ordonne alors de se contracter ce qui déclenche la pompe cardiaque et fait s'écouler le sang dans les poumons et à travers le corps.

Il arrive qu'un individu présente des troubles touchant ce système de conduction, dans ce cas le cœur se mettra à battre trop vite, trop lentement ou de manière irrégulière : on parle alors d'arythmie.

L'ablation par radiofréquence est une intervention médicale qui sert à corriger l'arythmie, c'est-à-dire un rythme cardiaque irrégulier.

L'intervention consiste à émettre des ondes radio dans le muscle cardiaque par l'intermédiaire de l'extrémité d'un cathéter. Ces ondes vont chauffer et détruire de façon très localisée le tissu cardiaque qui est responsable de l'anomalie du rythme. Dans la grande majorité de cas, le cœur retrouve un rythme normal suite à cette ablation.

Notre projet a pour objectif la validation d'un nouvel outil basé sur l'analyse par ultrasons, permettant d'estimer finement la morphologie des lésions thermiques radiofréquence, afin d'améliorer l'efficacité de ces procédures pour les patients humains.

Pour cela, des ablations identiques à celles réalisées en clinique, seront effectuées sur les muscles de la cuisse, chez des Porcs anesthésiés. Nous prévoyons l'utilisation d'au maximum 4 animaux (plus probablement 2), car la taille de leur muscles permettra la réalisation de nombreuses mesures (réduction du nombre d'individus). Après la chirurgie, les animaux seront euthanasiés, afin de réaliser des analyses histologiques sur les muscles lésés, et d'établir une corrélation entre les mesures ultrasons et les observations histologiques. On pourra ainsi modéliser la réponse des muscles pour une intensité de radiofréquence donnée.

Un programme d'hébergement, de soin et d'enrichissement du milieu adapté à l'espèce sera systématiquement mis en place, et les animaux seront hébergés en groupes d'individus compatibles.

8318 Le vieillissement s'accompagne d'un déclin progressif de la masse et de la fonction musculaire appelé sarcopénie. La sarcopénie a des conséquences métaboliques et fonctionnelles graves, incluant la perte d'autonomie et la mortalité. En raison de sa forte prévalence, 50% des plus de 80 ans, une meilleure compréhension de sa physiopathologie et la découverte de solutions thérapeutiques représentent un enjeu de santé publique majeur.

La perte de masse musculaire est liée à un déséquilibre entre la synthèse et la dégradation protéique musculaire. Ce phénomène est dû principalement à une diminution des apports nutritionnels (protéique et énergétique) et une diminution de la sensibilité des muscles à la synthèse protéique suite à la prise d'un repas (appelée résistance anabolique). Plusieurs autres mécanismes ont été mis en évidence parmi lesquels une modification des sécrétions hormonales. En effet une diminution du niveau de l'hormone de croissance (GH) et du facteur de croissance (IFG-1) est observée chez les personnes âgées. Ces hormones peuvent influencer les états anaboliques et cataboliques et donc le métabolisme protéique musculaire.

Le microbiote intestinal a récemment été démontré comme jouant un rôle clé dans la croissance juvénile via une augmentation des sécrétions hormonales. En effet, il a été démontré chez la drosophile et la souris qu'une souche bactérienne commensale de l'espèce *Lactobacillus plantarum* favorisait la croissance post-natale en cas de sous-nutrition chronique. Cet effet favorable sur la croissance est lié à une augmentation de la production d'IGF-1 observée chez des souris monocolonisées. De plus chez la drosophile, une augmentation de la digestion des protéines alimentaires via une activation de l'expression des protéases intestinales est observée en présence de la souche de *Lactobacillus plantarum*. L'ensemble de ces résultats laissent à penser que la souche *Lactobacillus plantarum* pourrait agir en tant que probiotique pour lutter contre la sarcopénie via une action sur la digestion des protéines et la régulation des hormones de croissance.

Ainsi l'objectif de ce projet est d'étudier l'impact de l'utilisation de la souche *Lactobacillus plantarum* comme probiotique dans un modèle animal de sarcopénie. Par ailleurs la principale stratégie nutritionnelle utilisée à ce jour étant l'augmentation des apports alimentaires protéiques, nous souhaitons étudier l'interaction entre un enrichissement de l'alimentation en protéines et la prise du probiotique. Enfin, des résultats préliminaires suggèrent que le probiotique pourrait agir de façon similaire après son inactivation par un traitement thermique. Ce dernier point est très important pour la future formulation d'un produit nutritionnel intégrant le probiotique.

Pour répondre à ces objectifs, des souris C57Bl/6 âgées de 20 mois seront soumises pendant 8 semaines à deux régimes nutritionnels, normo-protéique ou hyperprotéique, complétés ou pas avec la souche bactérienne *Lactobacillus plantarum* active ou inactivée par un traitement thermique (soit six sous-groupes). Les répercussions des différents régimes et du probiotique sur la masse et la force musculaire ainsi que sur l'homéostasie glucidique seront analysées.

L'utilisation d'animaux est essentielle pour la réalisation de notre projet car il requiert l'analyse des effets d'un probiotique sur un organisme intégré physiologiquement et métaboliquement.

Nous prévoyons l'utilisation d'un maximum de 144 souris sur une période de 3 ans. Ce nombre de souris nous permettra de tester l'effet protecteur du probiotique *Lactobacillus plantarum* contre la perte de masse et de force musculaire associé au grand âge chez la souris soumise à un régime normo ou hyperprotéique. Ce chiffre a été estimé au minimum nécessaire pour satisfaire les analyses statistiques et réaliser l'ensemble des analyses. En accord avec la règle des 3R, les souris seront surveillées tous les jours afin d'identifier et de limiter tout risque de souffrance ou de mal-être. Chaque souris sera suivie individuellement afin de collecter un maximum de données biologiques et ainsi limiter la quantité de souris au nombre minimum pour assurer des analyses statistiques fiables et interprétables.

8319 La polyarthrite rhumatoïde est une maladie auto-immune qui touche environ 1% de la population adulte. Elle se caractérise par une inflammation systémique et locale conduisant à une atteinte sévère des cartilages ainsi qu'à la destruction osseuse au niveau des articulations.

L'objectif principal de ce projet est d'étudier l'efficacité de différents produits (protéines humaines d'origine plasmatisée ou recombinante) à visée thérapeutique pour la polyarthrite rhumatoïde.

Pour cela un modèle rongeur d'arthrite induite par l'administration d'anticorps monoclonaux dirigés contre le collagène (CAIA) est développé. Le modèle CAIA est un modèle validé et relevant pour l'étude des mécanismes impliqués dans la pathogénie de la polyarthrite rhumatoïde. Dans ce modèle, la sévérité de l'arthrite est déterminée par l'établissement de scores cliniques tenant compte de l'inflammation locale des articulations (membres inférieurs et supérieurs) durant la période d'exploration souhaitée. Cette pathologie est induite de manière aiguë, par une injection unique d'un cocktail d'anticorps anti-collagène en présence d'un activateur de la pathologie.

L'efficacité des produits thérapeutiques testés est évaluée par une diminution partielle ou totale des scores cliniques associée ou non à une diminution des cytokines pro-inflammatoires circulantes. Dans le cas de l'évaluation d'une activité préventive, les produits sont administrés une ou plusieurs fois avant le cocktail d'anticorps anti-collagène. Dans le cas de l'évaluation d'une activité curative, ils sont administrés une ou plusieurs fois après le cocktail d'anticorps anti-collagène.

Pour évaluer l'efficacité d'un nouveau produit dans le cadre du traitement de la polyarthrite rhumatoïde, aucune méthode de remplacement in vitro reconnue par les autorités ni par la

communauté scientifique n'existe actuellement pour appréhender toute la complexité des mécanismes d'actions potentiellement impliqués dans la résolution de la pathologie.

Les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Dans le cadre de ce projet prévu sur 5 ans, le nombre maximal nécessaire est de 2400. Ce nombre a été déterminé grâce aux données d'études scientifiques et de données internes. Il a été réduit au minimum nécessaire afin de garantir la validité des résultats et de pouvoir les exploiter statistiquement. Des anesthésies sont pratiquées avant chaque injection et un recours à un analgésique pourra être fait si nécessaire afin de réduire la souffrance des animaux. S'agissant de modèles pathologiques, les animaux seront quotidiennement observés. L'application de critères d'arrêt et le suivi quotidien des animaux hébergés en groupe associé à des éléments d'enrichissements permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général, mobilité et poids) afin de nous permettre d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance autre que celle induite par la pathologie.

8320 Ce projet a pour but de mieux comprendre les circuits neuronaux contrôlant les prises de décisions en lien avec l'état émotionnel de l'individu. Ces systèmes de contrôles sont chez l'homme les circuits dont les dysfonctions engendrent des maladies psychiatriques telles que la dépression, les troubles bipolaires ou de l'anxiété, mais aussi l'addiction. En particulier, nous étudierons le développement et les fonctions d'un sous-circuit majeur le système habenulo-interpédonculaire. Nous avons identifié des gènes de développement essentiels pour que ces sous-circuits se forment normalement et il s'avère que certains de ces gènes sont des gènes de susceptibilité aux maladies psychiatriques citées plus haut. En couplant des approches de pointe chez la souris, telles que l'inactivation conditionnelle ou l'utilisation du promoteur de ces gènes, des cultures de tranches de cerveaux, des analyses comportementales de l'anxiété et de la dépression, des techniques d'électroporation in utero, des injections stéréotaxiques de vecteurs viraux non réplicatifs, nous évaluerons les fonctions du système habenulo-interpédonculaire dans un contexte normal ou pathologique. La souris transgénique est le modèle de choix nécessaire dans ce projet car elle permet une étude allant des gènes à la fonction des circuits neuronaux les exprimant. De plus, le système habenulo-interpédonculaire est très similaire entre la souris et l'homme. Tous les efforts seront mis en place pour optimiser l'utilisation de ces souris dans les règles des 3 R. - Réduire : Nous utiliserons un effectif suffisant pour réaliser un t-test ou test ANOVA. La taille des groupes et la qualité statistique seront régulièrement ré-examinées afin de réduire autant que possible le nombre d'animaux utilisés. Au total nous estimons avoir besoin de 1956 animaux. Les études histologiques seront réalisées dès que cela est possible en double ou triple marquages pour limiter la quantité de tissu nécessaire. Les animaux d'élevage sont partagés avec tous les PEA de l'équipe garantissant une optimisation de l'utilisation des animaux. - Raffiner : Les expérimentations sont limitées à des injections bénignes et des procédures sans réveil à part pour les injections stéréotaxiques qui seront très localisées et le moins invasif possible mais de classe modérée tout de même avec utilisation d'anesthésiques et d'anti-inflammatoires pour prévenir la douleur. Les phénotypes induits par les modifications génétiques ne porteront pas atteinte à l'intégrité des souris et ne causeront pas de dommages invalidants, car les délétions d'Otx2 seront temporellement et spatialement très limitées. - Remplacer : Les tests de l'efficacité des vecteurs viraux seront réalisés en culture sur des lignées cellulaires. Cette étude permettra d'obtenir de nouvelles informations cruciales pour comprendre le fonctionnement de ces circuits neuronaux et les mécanismes d'apparition des maladies associées.

8321 La rigidité artérielle est la principale cause de l'hypertension et l'hypertrophie cardiaque dans le vieillissement conduisant à une insuffisance cardiaque chronique. Le problème est de pouvoir quantifier précisément le niveau de rigidité de nos artères qui se traduit sur le plan physiologique, par une perte de l'élasticité artérielle. De nombreuses études ont démontré la pertinence des paramètres mécaniques des artères (compliance, distensibilité, etc.) dans l'évaluation de la rigidité artérielle.

Notre laboratoire dispose d'un système de référence utilisant la technique d'echo-tracking basée sur une sonde ultrason qui suit la déformation des parois artérielles (due à la pression artérielle) chez le rongeur. Il est ainsi possible de mesurer simultanément les variations de la pression artérielle et du diamètre de l'artère sur plusieurs cycles cardiaques et de calculer les paramètres mécaniques. L'inconvénient de ce système repose sur la difficulté à localiser l'artère, à régler et mettre au point du

système, ce qui prolonge la durée de l'expérience, au détriment de l'animal et le manque de précision. Nous souhaitons donc développer un nouveau système palliant à ces problèmes en utilisant un système d'échographie pour petit animal. Ce dernier offre une précision de mesure optimale et permet une localisation précise et rapide de l'artère. De plus, cette amélioration permettra une manipulation plus rapide, améliorant le bien-être de l'animal.

Le but de ce projet est de valider ce nouveau système en comparant les mesures obtenues avec ce nouveau système et celles obtenues avec le système déjà existant. Pour ce faire, nous avons besoin d'étudier la reproductibilité des mesures sur au moins 30 souris de type C57BL/6 sauvages (Groupe 1 : 15 souris utilisées avec le nouveau système développé ; Groupe2 : 15 souris utilisées avec le système de référence)

Ces deux techniques nécessitent de travailler sur l'animal vivant. Pour répondre aux demandes de la règle du raffinement, les souris seront hébergées dans des cages individuellement ventilées mesurant 36 x 15 cm, avec entre 1 et 5 (maximum) souris par cage. Elles seront nourries ad libitum avec les croquettes adaptées. La litière est changée une fois par semaine. L'enrichissement du milieu se fera avec sizzle nest (papier plissé) et bâtonnets de bois (top brick). Les manipulations se font dans des pièces dédiées à cet effet, séparément des pièces d'hébergement pour ne pas stresser les animaux. Toute la procédure est faite sous anesthésie gazeuse à l'isoflurane (3% dans 1.5L/min d'oxygène) et dure environ 30 min. Pour juger ses points limites, nous surveillerons les paramètres suivants : la fréquence cardiaque, la pression artérielle, la fréquence respiratoire, la température. Tous ces paramètres ne doivent pas descendre au-delà de 30% des paramètres initiaux. Les animaux sont euthanasiés à la fin de l'examen.

L'utilisation de la technique développée nous permettra d'apporter des éléments essentiels pour la compréhension des mécanismes du développement des pathologies cardiovasculaires.

8322 *Coxiella burnetii* est l'agent causal de la maladie zoonotique de la fièvre Q. Ce micro-organisme est répandu dans le monde entier, les réservoirs de l'agent pathogène sont nombreux chez les mammifères sauvages et domestiques. On peut le détecter chez les bovins, les moutons, les chèvres et autres mammifères domestiques, ainsi que les chats et les chiens. La transmission de l'infection se fait par voie aérienne par l'inhalation de particules contaminées en suspension dans l'air et le contact cutané ou muqueux avec les selles, l'urine, les sécrétions vaginales, le sperme, le lait, le placenta des animaux infectés. La période d'incubation est de 9 à 40 jours. Il s'agit probablement de la zoonose (maladie transmissible à l'homme) la plus contagieuse qui existe, car une seule bactérie suffit à infecter un homme. Coxevac, le seul vaccin sur le marché des ruminants est produit sur œufs de poule par un groupe pharmaceutique en santé vétérinaire. Le développement d'un vaccin de deuxième génération contre *Coxiella* permettra de produire l'antigène vaccinal dans une lignée cellulaire évitant ainsi le passage sur œuf. L'efficacité de ces nouveaux lots de vaccins expérimentaux sur des lignées cellulaires sera donc testée chez la souris en vue d'être transposées sur les espèces cibles - moutons et chèvres. Cette expérimentation nécessitera l'utilisation de 120 souris dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Il n'existe aucune méthode autre permettant de démontrer l'efficacité vaccinale in vivo.

- Réduction : Le nombre d'animaux est calculé au plus juste à l'aide d'outils statistiques (tests statistiques non paramétriques spécialement conçus pour comparer des groupes de petits effectifs) garantissant une puissance de test de 80% minimum en s'appuyant sur les données de la littérature et l'expérience de l'utilisation du vaccin commercial actuel.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en animalerie A2 en atmosphère contrôlée, à raison de 5 souris maximum par cage dans un environnement enrichi (tunnel, papier absorbant, nid). Toute médication pouvant interférer avec l'efficacité des vaccins est proscrite. Cependant les animaux sont suivis plusieurs fois par jour (enrichissement social) pour détecter les signes cliniques précoces et afin de prendre une décision rapide en cas d'atteinte des points limites.

8323 Le but du projet est de déterminer l'impact de la délétion d'un gène sur l'état général de la souris, son comportement, ses capacités sensori-motrices et d'apprentissage, ainsi que sa réaction à la douleur.

Ce projet va donc être réalisé en utilisant des souris génétiquement modifiées, seuls animaux pour lesquels les techniques de mutation génétique sont actuellement bien maîtrisées. De plus l'utilisation d'un mammifère est indispensable car aucune méthode in vitro ou in silico ne peut actuellement se substituer à l'étude du gène cible dans son environnement et ses interactions au sein de l'organisme.

Pour procéder à cette étude, des souris mutantes n'exprimant plus le gène d'intérêt sont générées et étudiées. 48 animaux seront utilisés afin d'obtenir une puissance statistique suffisante à l'étude.

Ces animaux seront soumis à deux protocoles incluant différents tests permettant de caractériser les fonctions cognitives, sensorielles, ainsi qu'une observation approfondie des animaux. Tous les tests utilisés font partie des tests de phénotypage classiquement utilisés dans la recherche préclinique et décrits dans la littérature. Ces deux séries de tests permettent de mettre en place un corpus de données visant à déterminer l'impact de cette mutation génétique sur les fonctions neurologiques majeures et sur l'état de santé de l'animal. Ce protocole permet ainsi de réduire le nombre d'animaux utilisés afin de satisfaire les exigences de réduction.

Le bien-être des animaux sera pris en compte tout au long de l'étude, avec un suivi journalier de la boisson, la nourriture et de l'état des animaux. Les souris utilisées ont plus d'un an d'âge, aucune altération de leur état n'a été notée jusqu'à présent et aucun phénotype douloureux majeur n'est attendu.

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

Ce projet pourra s'appliquer à 10 lignées différentes par an, pour un nombre total d'animaux de 480 souris par an soit un maximum de 2400 sur toute la durée du projet.

Ces lignées ne concerneront que des phénotypes non dommageables et ce dossier sera mis à jour en cas de lignée au phénotype dommageable.

8324 Le psoriasis est une maladie au niveau mondial. Au cours de la maladie, les cellules de la peau se multiplient trop rapidement, ce qui provoque une inflammation de la peau visible sous forme de plaques rouges et une accumulation de squames blanches qui peuvent se trouver sur tout le corps et rendre cette maladie particulièrement affichante dans ses formes sévères.

Pour étudier la physiopathologie du psoriasis, de nombreux modèles précliniques existent, en majorité des modèles murins. Parmi eux, nous utiliserons un modèle de peau psoriasique induit par l'application topique d'Imiquimod chez la souris, afin d'évaluer l'efficacité de différents traitements à base d'une molécule (Ruxolitinib) sur le traitement du psoriasis.

Les retombées attendues suite à ce projet sont la mise au point d'un traitement du psoriasis sans effets secondaires grâce à un modèle de peau psoriasique chez la souris.

Notre projet inclus la règle des 3R.

Une preuve de concept in vitro n'est pas suffisante pour valider le développement de nouveaux systèmes d'administration, c'est pourquoi il nous faut utiliser des modèles in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert une approche intégrée. Le nombre de souris nécessaire à nos travaux a été réduit au minimum sans compromettre l'interprétation statistique de nos résultats. Les souris seront suivies avec un soin particulier et des points limites sont clairement définis, afin de détecter précocement tout signe de souffrance.

Ce projet concernera 294 souris au maximum.

8325 Le projet consiste à tester l'administration de molécules (protéines, sucres, lipides) qui peuvent être reconnues par le système immunitaire. L'objectif du projet est de définir des formules moléculaires, administrables à un individu en vue d'éliciter des réponses immunitaires conférant une protection de type vaccin.

Le projet est conçu en tenant compte des directives Européennes (voir Official Journal of the European Union L 276/33). : « Reduce, Refine, Replace ». Avant toute expérimentation animale, les formules moléculaires seront analysées par une série d'essais sur cellules immunitaires en culture

afin d'évaluer leurs effets toxiques et inflammatoires potentiellement délétères pour les animaux. Cette phase in vitro du projet permet de sélectionner les meilleurs candidats de formules moléculaires pour leur administration chez la souris et par cela de réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérimentation animale et d'affiner le protocole d'immunisation en fonction de type de réponses immunitaires désirées. Seules les formules présentant un intérêt entreront dans les immunisations chez la souris. Pour ce projet le nombre maximal d'animaux sera de 50 souris.

Les formules utilisées pour les immunisations ne conduisent pas à des souffrances des animaux. Au cas où des animaux présenteraient des symptômes de prostration ou des évidences d'inflammation notamment cutanées (notamment lors des injections sous cutanées), ceux-ci seront considérés en fin d'expérimentation et euthanasiés.

En l'état actuel des connaissances technologiques, il n'est pas possible de réaliser ce type d'expérience totalement in vitro notamment en ce qui concerne l'induction de réponse immunitaire primaire.

Les résultats du projet fourniront la définition de formules vaccinales, plus sûres et plus efficaces, qui seront ensuite développées pour la vaccination animale (animaux de compagnies et bétails) et humaine.

8326 Les communications inter-auriculaires (CIA) représentent la malformation cardiaque la plus fréquemment observée chez l'adulte. Leur traitement a longtemps consisté en une fermeture chirurgicale mais, depuis environ 20 ans, le développement des techniques de cathétérisme interventionnel permet leur occlusion de manière sûre et peu invasive dès l'enfance (à partir de 10-15 kg). La très grande majorité de ces occlusions est réalisée grâce à des prothèses en nitinol (alliage de nickel et de titane). Ces prothèses ont d'excellents résultats à court et moyen terme mais posent 2 principaux problèmes au long cours : 1) un défaut de cicatrisation et d'endothélialisation de la prothèse entraînant la formation potentielle de caillots et 2) un relargage de Nickel excessif responsable d'une hypersensibilité et de tableaux migraineux parfois sévères. De nouvelles prothèses également fabriquées en nitinol, mais dont le recouvrement devraient permettre une meilleure cicatrisation au sein du cœur et un relargage de Nickel moindre, sont actuellement mises au point. Ces données sont théoriques et doivent être validées in vivo.

Ce projet a pour but de caractériser la biocompatibilité et la durée de cicatrisation de cette nouvelle prothèse mais également le relargage de Nickel qu'elle occasionne.

Ce projet sera développé autour d'un modèle animal porcin de CIA. En effet, afin de nous permettre de répondre aux questions d'ordre clinique, des modèles animaux de pathologies humaines et des tissus animaux sont nécessaires afin d'avoir une représentation complète de la physiologie du corps entier (REPLACER). Le porc a été choisi en raison de la proximité de son anatomie avec l'homme, notamment au niveau du septum inter-atrial et des oreillettes et de sa croissance accélérée. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés dans cette étude et dans le but d'obtenir un plus grand bénéfice de l'utilisation de ces animaux, nous avons fixé une limite maximale de 9 cochons au total (REDUIRE). Il s'agit, de par notre expérience, du nombre minimal d'animaux nécessaire à l'obtention de données de qualité optimale et permettant une analyse statistique fiable. Les animaux seront répartis en 3 groupes pathologiques en fonction de la durée de suivi. Si les objectifs expérimentaux peuvent être atteints par l'utilisation de moins d'animaux, alors plus aucun animal supplémentaire ne sera utilisé. D'autre part, nous sommes en mesure de pratiquer la plupart des différentes investigations à la suite les unes des autres (étude de biocompatibilité, relargage du Nickel) ce qui nous permettra d'accroître la quantité d'informations obtenues à partir d'un animal et ainsi de limiter l'utilisation globale d'animaux. Les résultats de cette étude seront précieux quant à la validation de cette nouvelle prothèse permettant de diminuer le nombre de complications survenant après fermeture. Tout au long des procédures les animaux seront pris en charge avec toutes les mesures nécessaires à leur bien-être (RAFFINER) : au cours de l'hébergement (locaux agréés, personnel compétent, conditions d'hébergement garantissant leur bien-être – alimentation, enrichissement spécifique à l'espèce, etc.) et au cours des procédures (mise en place de protocole rigoureux de prise en charge de la douleur – anesthésie et analgésie).

8327 L'infection par le cytomégalo virus congénital (CMV) est la principale cause infectieuse de malformations congénitales et la deuxième cause de surdité congénitale. L'incidence élevée de la perte auditive chez les enfants est due au tropisme particulier du virus pour l'oreille interne. Le mécanisme physiopathologique précis n'est pas encore complètement compris.

La prévention de la dégradation du seuil auditif et le traitement curatif de la maladie systémique chez les nouveau-nés repose sur la prescription de Ganciclovir. Cependant, cette molécule a plusieurs effets secondaires importants qui peuvent limiter son utilisation. Deux nouvelles molécules, le Maribavir et le Letermovir, sont évaluées chez des patients immunodéprimés plus âgés; ils semblent aussi efficaces dans ce contexte sans présenter d'effet secondaire majeur.

Le but de cette étude est d'établir, sur un modèle murin, l'efficacité de ces deux molécules sur l'audition dans le contexte d'une infection CMV congénitale. Selon le modèle utilisé dans les études précédentes, les embryons de souris seront infectés transplacentairement   E13 avec le CMV murin équivalent (MCMV).   la naissance, les souriceaux seront répartis en 5 groupes en fonction de leur traitement : souris témoins non infectées, souris non traitées infectées par le CMV, souris infectées avec le MCMV traitée par Ganciclovir, souris infectées avec le MCMV traitée par Letermovir et souris infectées avec le MCMV traitée par Maribavir. La présence virale chez les nouveau-nés sera évaluée par PCR sur des échantillons salivaires prélevés à la naissance et   3, 6 et 9 semaines. Cela démontrera la négativation progressive de la charge virale dans les différents bras thérapeutiques. L'effet clinique des traitements sera évalué sur la survie post-natale des jeunes souris, les mesures des potentiels évoqués auditifs et leurs poids. Les souris seront euthanasiées à 9 semaines : un examen histologique et immunohistologique des oreilles internes sera réalisé. Dans une étude parallèle, nous explorerons la pharmacodynamie de ces molécules chez la souris et leur toxicité potentielle. Cela nous permettra d'évaluer le rapport efficacité / toxicité des différentes molécules. Cette étude est la première à évaluer la pertinence de ces nouvelles molécules antivirales dans la prévention de la surdité dans l'infection congénitale à CMV.

Règle des 3 R :

- Réduction : Compte-tenu de la forte mortalité liée au modèle d'infection congénitale, nous avons déterminé le nombre minimal de souriceaux nécessaires dans chaque sous-groupe permettant d'avoir une analyse statistique, significative ou non, soit un minimum de 12 souris par sous-groupe, soit au total 60 souris.

- Raffiner : Les signes extérieurs de souffrance, chez la mère gestante injectée, ou chez le souriceau (souris prostrée ou au contraire très agitée, fuyante, aux poils hérissés) seront les critères de points limites, à partir desquels la souris sera euthanasiée. Les souris seront hébergées dans une animalerie calme A2, bénéficieront d'enrichissement dans leur cage et seront surveillées quotidiennement. Lors des procédures douloureuses (chirurgie) ou des potentiels évoqués, ils seront anesthésiés à l'isoflurane. Un traitement antalgique sera administré après les gestes invasifs si nécessaire. Ils seront réchauffés à la suite des procédures d'injection.

- Remplacer : compte-tenu de la spécificité d'espèce du virus et de la complexité de structure de l'oreille interne, et en particulier du vestibule, il n'est pas possible de remplacer ce modèle animal par d'autres modèles. Les souris utilisées ne sont pas génétiquement modifiées, sans phénotypes dommageables.

Le nombre de souris nécessaires est de 30 femelles gestantes et 132 souriceaux.

8328 Le gros intestin du cheval abrite une flore abondante et diversifiée composée de micro-organismes, qui assure un rôle nutritionnel crucial et participe à la santé du cheval. La stabilité de cette flore repose sur un équilibre fragile. De nombreux facteurs, comme la prise d'antibiotiques, peuvent la perturber. Les antibiotiques sont impliqués dans la survenue d'inflammations du gros intestin appelées colites. Elles sont souvent fatales, et leur taux de mortalité peut atteindre 70% chez le cheval. Aucune étude scientifique ne montre de lien entre une perturbation de la flore du gros intestin du cheval et le développement d'une réaction inflammatoire. Chez d'autres modèles mammifères, une modification de la flore intestinale induirait des dérégulations immunitaires responsables d'une réponse inflammatoire pouvant affecter la barrière intestinale. Il est donc important de limiter les déséquilibres

de la flore intestinale lors de l'utilisation d'antibiotiques pour diminuer l'apparition des colites. Une voie semble prometteuse : celle des probiotiques.

Les probiotiques sont des « micro-organismes vivants qui, lorsqu'ils sont ingérés en quantité suffisante, exercent des effets positifs sur la santé de l'hôte ». A ce jour, aucune bactérie n'est enregistrée en tant que « stabilisateur de flore », chez le cheval, en Europe. Pourtant, des études montrent l'intérêt des probiotiques bactériens pour limiter les perturbations de la flore intestinale du cheval. La supplémentation probiotique serait donc un moyen de stabiliser la flore intestinale et de diminuer la survenue des colites liée à la prise d'antibiotiques. Or, l'effet des probiotiques bactériens sur la réaction inflammatoire dans le gros intestin n'est pas connue.

L'objectif est d'évaluer l'efficacité in vivo d'un probiotique bactérien sur la réaction inflammatoire provoquée par des antibiotiques dans le gros intestin des chevaux. L'utilisation d'animaux vivants dans l'étude est requise pour obtenir une homologation européenne du probiotique bactérien testé. Le schéma expérimental est composé de 3 périodes de 5 semaines séparées par 3 semaines de repos. Ce dispositif permet d'utiliser un nombre minimal de chevaux. Les chevaux inclus dans l'étude sont neuf hongres Trotteur Français adultes. L'investigation de marqueurs dans le sang et les fèces sera privilégiée à l'examen endoscopique et permettra de limiter l'angoisse et la souffrance des chevaux. Le nombre de prélèvements fécaux et sanguins sera strictement limité à 6 et à 8 respectivement, par période et pour les besoins de l'étude. L'utilisation de marqueurs est une innovation qui pourra être mise en pratique à l'avenir dans la médecine vétérinaire équine. La modification de la flore intestinale et la réponse inflammatoire sont générées par des antibiotiques répandus en France. Ils sont administrés dans la bouche du cheval avec une seringue. L'antibiotique permet d'évaluer l'impact des probiotiques bactériens en tant que « stabilisateur de flore » chez le cheval. L'antibiothérapie est une pratique courante en médecine vétérinaire qui n'inclut pas de danger pour la vie des chevaux. Toutefois, pour assurer la santé des animaux, une procédure de surveillance quotidienne par les animaliers est instaurée. Les chevaux qui présenteraient des signes de mal-être ou de souffrance sont soignés et retirés de l'essai si jugé nécessaire par le vétérinaire traitant.

8329 Le surpoids et l'obésité infantiles se sont de plus en plus répandus ces dernières décennies dans les pays industrialisés. De plus, les traitements classiques tels que la restriction alimentaire ou l'augmentation de la dépense physique, semblent tous échouer dans la durée. Ce problème pourrait être plus efficacement résolu par sa prévention, et par conséquent la connaissance de ses causes est primordiale. Des études montrent que le meilleur facteur prédictif dans le développement futur de l'obésité chez l'enfant de 8 ans est l'indice de masse corporelle de la mère avant et pendant la grossesse. Des facteurs génétiques, sociaux, comportementaux et alimentaires entrent bien sûr en ligne de compte, mais la totalité des raisons de cette « transmission » d'obésité n'est encore que partiellement connue. Or chez les patients obèses, ainsi que dans les modèles animaux d'obésité, la composition du microbiote intestinal (ensemble des espèces bactériennes présentes dans l'intestin) est différente de sujets ou d'animaux de poids normaux. De nombreux travaux démontrent que le microbiote intestinal est impliqué dans la régulation de la prise alimentaire, du métabolisme énergétique et de la composition corporelle de l'hôte.

Ce projet pose l'hypothèse que la transmission du microbiote maternel de mère obèse à l'enfant pendant la période de développement précoce pourrait influencer le métabolisme infantile en agissant sur le développement cérébral : les structures cérébrales impliquées dans le métabolisme, l'appétit et la prise alimentaire seraient modifiées par des dérivés bactériens.

Pour tester cette hypothèse, nous inoculerons des rates gestantes axéniques, c'est-à-dire dépourvues de toute espèce bactérienne, avec des microbiotes provenant de rates gestantes obèses ou non obèses. Ce transfert de microbiote est obligatoire si l'on veut déterminer la contribution du microbiote. En effet, chez les rates obèses, la perturbation du métabolisme est telle qu'elle ne permet pas d'étudier l'impact du seul microbiote. Cette inoculation sera réalisée par un gavage vers la fin de la gestation. Les rates seront hébergées pendant la gestation et après la mise bas dans des isolateurs stériles, avec 1 rate par cage, et du matériel destiné à leur bien-être (Sopalin pour la nidification, bâtons à ronger) sera procuré. Les mères et les ratons sevrés seront nourris avec un régime commercial riche en graisses. Les portées seront homogénéisées à 5 ratons de chaque sexe. Mères et portées seront pesés 2 fois par semaine, et leur prise alimentaire sera enregistrée par pesée. Un test de tolérance

au glucose sera effectué sur les mères et les rats sevrés : ce test comporte un gavage de solution riche en glucose, et des prélèvements sanguins par petite incision de la queue. Les mères seront euthanasiées après le sevrage. Les rats seront euthanasiés à différents temps de leur croissance (P2(naissance), P22 (sevrage) et P40) afin de récupérer sang et cerveau. En ce qui concerne l'euthanasie des mères et des rats P40, ces animaux seront anesthésiés puis une perfusion intracardiaque sera réalisée afin de fixer le cerveau le plus rapidement possible. Cette intervention, est réalisée par une personne expérimentée. La veille de l'euthanasie, une prise de sang sub-mandibulaire sera effectuée. Les rats P2 et P22 seront euthanasiés par décapitation, elle aussi réalisée par du personnel expérimenté.

Dans cette étude, nous prévoyons d'utiliser 4 rates par type de microbiote pour assurer un nombre suffisant de rats. Cependant, l'efficacité de la reproduction est très variable, selon notre expérience, et par conséquent nous prévoyons également de faire 3 répétitions, ce qui porte le nombre maximum de rates à 32 et de rats à 320.

Seule l'utilisation d'animaux permet d'étudier les interactions complexes entre un microbiote intestinal particulier et le fonctionnement de l'axe intestin-cerveau, aboutissant à la survenue de troubles alimentaires et métaboliques. Les états de santé et de bien-être des mères et des portées seront évalués quotidiennement. L'ensemble des soins donnés aux animaux visera à satisfaire le mieux possible leurs besoins physiologiques et comportementaux, conformément à la législation.

8330 Le contexte de nos études est le développement de thérapies innovantes contre le cancer, en particulier les cancers résistants pour lesquels il n'existe pas de traitements efficaces. Dans ce cadre, nous souhaitons tester le potentiel antitumoral de nouveaux composés issus de nos travaux de recherches dans des modèles murins de xénogreffes de cellules tumorales humaines. Cependant, afin d'obtenir les meilleures réponses, il est nécessaire auparavant de définir les doses optimales ainsi que la fréquence d'administration.

Pour cela, nous souhaitons réaliser une expérience préliminaire dans le but de :

-Déterminer la toxicité aiguë des composés suite à une administration intraveineuse (IV) de doses élevées et faibles de composés. Cela permettra de définir les doses utilisables pour les expériences ultérieures.

-Déterminer les paramètres pharmacocinétiques (V_{ss} , $t_{1/2}$, CI). Ces données permettront de définir la fréquence optimale d'administration.

-Approfondir nos connaissances pharmacodynamiques : Nos tests in vitro sur cellules nous ont permis d'identifier plusieurs protéines de signalisation (ERK, S6K, etc.) qui sont modifiées (niveau d'expression, états de phosphorylations) en réponse au traitement par les composés. Ces protéines sont déjà utilisées comme biomarqueurs pour la stratification de patients ou le suivi d'efficacité dans plusieurs phases I/II d'essais cliniques. Elles constituent ainsi des biomarqueurs validés. Nous voulons tester, chez l'animal, la pertinence des observations faites sur lignées cellulaires. Si la pertinence est établie, cela permettra alors de suivre l'initiation et la durée d'action des composés dans les tissus cibles. En combinant ces observations avec les données pharmacocinétiques, cela nous permettra d'affiner le schéma d'administration.

Avantages et dommages escomptés

L'expérience permettra de réaliser, dans les conditions d'administrations optimales, les expériences de validation de l'efficacité thérapeutique de nos composés.

Nombre total et types d'animaux

Les expériences ultérieures d'efficacité thérapeutique seront réalisées sur modèle murin femelle. Cette expérience préliminaire sera donc réalisée sur souris femelles. Nous prévoyons 5 groupes de 6 souris chacun, soit un total de 30 animaux.

Démonstration 3R

• Remplacer

L'obtention de paramètres pharmacocinétiques et pharmacodynamiques peuvent être obtenus uniquement par l'emploi d'animaux. De même, les effets toxiques potentiels seraient surtout

systémiques et ne pourraient être détectés en utilisant des expériences de lignées cellulaires, ceci justifiant l'utilisation de tests chez l'animal. Le choix, dans ce protocole, d'un modèle murin est lié aux modèles employés dans les expériences ultérieures d'efficacité thérapeutique qui sont eux-mêmes murins.

- Réduire

A partir d'une chimiothèque (collection de molécules chimiques) de 8000 composés, nous avons par une série de tests sur cellules en culture in vitro, sélectionné 15 molécules d'intérêt. Grâce à des tests complémentaires (dont des tests de génotoxicité in vitro) ainsi qu'une analyse approfondie de la littérature disponible concernant la toxicité des classes chimiques des molécules considérées, nous avons focalisé nos efforts sur 2 composés, constituant les candidats les plus prometteurs de ce projet. Cela nous a ainsi permis d'éviter de tester les 15 molécules sur animal.

Cependant, nous avons désormais atteint un stade du projet où nous devons évaluer d'éventuelles toxicités systémiques, dont l'évaluation par des tests in vitro n'est pas, à ce jour, possible.

Concernant les tests sur animaux, nous nous sommes efforcés de faire en sorte que l'effectif utilisé soit minimal. Cela permet ainsi de réduire le nombre d'animaux employé autant que possible tout en obtenant des informations scientifiques avec une validité statistique suffisante. En effet, l'analyse d'un ensemble de marqueurs de toxicité nous permettra d'effectuer une analyse approfondie de la toxicité des composés.

De plus, le groupe contrôle sera commun pour les deux composés évalués. Ainsi, la formulation optimale pour le composé le moins soluble sera utilisée pour les deux composés. En effet, de par leurs structures fortement polaires, les composés biguanides sont solubles dans la plupart des formulations.

- Raffiner

Afin d'employer au mieux les animaux, le protocole présenté permet également d'obtenir des informations complémentaires des données de toxicité, notamment des informations pharmacocinétiques et pharmacodynamiques. Ce recueil d'informations, n'altère en rien la qualité de données de toxicité et permet de compléter nos connaissances sur les composés, ce qui évite des expériences de PK/PD dédiées. Au terme de cette expérience, l'intégralité des animaux sera euthanasiée. Le protocole présenté comporte des étapes d'injection et de prélèvements IV qui seront réalisées sous anesthésie.

8331 Les mammites représentent une infection fréquente en élevage bovin ; elles sont responsables de pertes économiques qui contribuent à la fragilité des exploitations agricoles et impactent le bien-être des animaux. Une meilleure prise en charge de ces infections repose en partie sur une meilleure connaissance des mécanismes que permettent à l'animal de répondre efficacement à ces infections. L'existence de vaches présentant des capacités de résistance aux mammites différentes est une opportunité à saisir pour tenter de comprendre les mécanismes à l'origine de ces différences.

Le protocole expérimental consiste à étudier les capacités immunitaires de ces vaches sélectionnées pour être plus résistantes ou plus sensibles aux mammites. Cette évaluation sera réalisée à partir de prises de sang pour mesurer la réponse des cellules sanguines à une stimulation par des composés bactériens pro-inflammatoires.

Le protocole concernera au total 200 vaches, une moitié appartenant au lot « résistantes » et l'autre au lot « sensibles ». Sur ces 200 vaches, 50 auront été au préalable vaccinées avec un antigène modèle (une seule injection).

Le projet est conçu pour être en conformité avec les exigences 3R :

Remplacement : les informations collectées lors de ce protocole ne porteront pas sur des espèces modèles (souris) mais sur une espèce concernée par les mammites (vache). Par ailleurs, la méthode choisie permettra de réaliser un profilage détaillé et précis de la réponse immunitaire des vaches à partir d'un seul prélèvement de sang par animal.

Réduction : le nombre d'animaux prévu est nécessaire pour essayer de mettre en évidence des points communs entre vaches d'un même groupe, sachant que ce ne sont pas des animaux congéniques.

Ce nombre est par ailleurs suffisant pour obtenir une puissance statistique permettant de comparer la réponse des animaux avec leur appartenance au lot résistant ou au lot sensible.

Raffinement : la méthode utilisée pour la caractérisation de la réponse des cellules sanguines est optimisée pour minimiser les biais liés aux prélèvements, comme cela a été décrit chez l'homme, et pour permettre, à partir d'un seul prélèvement sanguin, d'effectuer plusieurs stimulations indépendantes avec divers composés pro-inflammatoires. Les prises de sang réalisées ne nécessitent qu'une contention minimale, les animaux étant habitués à être pris au cornadis pour la distribution des aliments. La douleur causée par l'aiguille ne nécessite pas d'anesthésie.

8332 Ce projet a pour objectif de tester chez la souris le pouvoir protecteur de nouveaux vaccins élaborés à partir du vaccin vivant atténué contre la rougeole, un des vaccins les plus sûrs et efficaces jamais inventés. Nous développons ainsi de nouveaux vaccins contre plusieurs maladies infectieuses de l'homme.

Le test de ces vaccins potentiels sur l'animal est une étape indispensable avant de réaliser des études chez l'homme. Elle nous permet de mesurer la capacité du vaccin à produire une réponse immunitaire et à apporter une protection efficace contre l'agent infectieux. Ces propriétés ne peuvent pas être évaluées autrement que sur un organisme entier.

Pour obtenir les vaccins les plus efficaces, nous testons différentes variantes du vaccin dans différentes conditions afin de trouver les combinaisons qui donnent la meilleure protection. Des réplifications sont nécessaires pour valider les données. Les effectifs sont calculés au plus juste de façon à pouvoir conclure.

Au cours de ce projet sur 5 ans, 3400 souris seront utilisées pour évaluer les capacités à induire une réponse immunitaire des vaccins que nous développerons contre 4 maladies infectieuses. Une première étape consiste à sélectionner les meilleurs vaccins qui seront ensuite testés pour leur efficacité à protéger contre ces infections. Des souris seront alors immunisées puis infectées par ces agents infectieux pour tester si les nouveaux vaccins confèrent une protection. Compte tenu du nombre de vaccins que nous allons tester, nous prévoyons qu'un maximum de 75 souris par an et par agent infectieux seront utilisées. Au total, environ 2000 souris seront utilisées dans 2 procédures de gravité légère ; 600 souris seront utilisées dans une procédure de gravité modérée et 800 dans une procédure de gravité sévère. Pour chaque maladie infectieuse, les animaux seront surveillés quotidiennement pour détecter des signes de souffrance et des points limites ont été définis pour anticiper la mort de l'animal sans affaiblir l'expérience.

Le but ultime de ce projet est la mise à disposition de vaccins préventifs contre plusieurs pathologies infectieuses graves pour lesquelles il n'en n'existe pas.

8333 TransPPA-Vec : Mécanismes de transmission vectorielle du virus de la Peste Porcine Africaine et facteurs influençant cette transmission : étude de différentes associations tiques-virus.

La peste porcine africaine (PPA) est une fièvre hémorragique des suidés particulièrement létale pour le porc domestique. Son cycle épidémiologique est complexe et varié d'une région à une autre du monde. La transmission du virus de la PPA peut se faire par contact direct entre suidés, par contact avec du matériel contaminé, par consommation de viande de suidé infecté, ou encore par morsure de tique *Ornithodore* infectée. Depuis son introduction en 2007 dans le Caucase puis sa progression au sein de l'Union Européenne à partir de 2014, la question du rôle des tiques européennes telles qu'*Ornithodoros erraticus* comme vecteur de la souche circulant en Europe, Georgia2007/01, est posée. Une étude préalable conduite sur le couple *O. erraticus*-Georgia2007/01 suggère l'absence de transmission vectorielle aux porcs malgré une infection avérée des tiques. Ainsi, pour le modèle tique *Ornithodore*-virus de la PPA, se pose plus largement la question de ce qui fait qu'une transmission vectorielle est efficace ou non : est-ce un simple « effet dose » par lequel plus une tique est infectée plus elle a de chances de transmettre le pathogène, ou est-ce un « effet barrière » faisant intervenir des systèmes de reconnaissance spécifiques entre la tique et le virus ?

Ce projet aura pour objectif de répondre à cette question grâce à l'étude de différents couples tiques-virus (potentiellement 4 espèces d'intérêt pour les *Ornithodoros*, et 6 isolats viraux différents) dont nous avons la maîtrise dans nos laboratoires et pour qui nous prédisons des succès de transmission

variables, afin de décrire les mécanismes en jeu dans la transmission vectorielle du virus de la PPA et d'identifier certains facteurs aussi bien chez la tique que chez le virus pouvant expliquer ces différences de transmission.

Pour chacun des couples « tiques-virus » étudiés seront mis en place deux essais in vivo (procédure) sur porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS). Les procédures seront menées dans le respect de la règle des 3R. Le remplacement n'est pas possible en l'absence de méthode alternative validée pour mener à bien ces travaux. Le nombre de porcs impliqués dans ces procédures sera réduit au seuil de la pertinence scientifique. Les mesures de raffinement viseront à assurer des conditions d'hébergement limitant le stress potentiel des animaux.

1/ La première procédure visera à infecter naturellement les tiques par gorgement sur porcs EOPS infectés au pic de virémie. Les porcs seront inoculés par voie intramusculaire selon le modèle infectieux maîtrisé au laboratoire pour obtenir des porcs au pic de virémie 4 à 6 jours post inoculation. Cette procédure nécessite 2 à 3 porcs par couple « tique-virus » selon le nombre de tiques disponibles pour le gorgement, plus les porcs témoins de chaque essai expérimental (2). Si tous les couples « tique/isolat » sont testés, cette procédure nécessitera au maximum 45 porcs.

2/ La seconde procédure visera à évaluer la transmission de la souche virale de PPA des tiques infectées à des porcs sains par gorgement, huit semaines après le gorgement infectieux initial. Pour un couple « tique/isolat », le gorgement sur porcs sera réalisé de deux manières ; soit en seul gorgement pour deux porcs (30 tiques/porc), soit en gorgement répété (15 tiques/pose/porc), trois fois, à 4 à 5 jours d'intervalle, pour deux autres porcs. Cette seconde procédure nécessitera minimum 4 porcs par couple « tique-virus », ce nombre pouvant aller à 6 si le nombre de tiques disponibles était suffisant. Il faut aussi prévoir les porcs témoins (2) à chaque essai expérimental mis en place. Au total 72 animaux seront utilisés.

Le projet sera mené sur cinq années et la combinaison des deux procédures sera répétée au fur et à mesure du temps pour traiter au minimum 6 couples « tique-virus ».

Pour chacune de ces 2 procédures, la virulence des souches virales sera comparée suite à l'administration initiale au porc par inoculation intramusculaire ou à la piqûre par tique infectée à travers la mesure des paramètres zootechniques, cliniques, biologiques et virologiques. Au total, pour l'ensemble du projet, 117 porcs seront nécessaires. Le nombre d'animaux utilisés est réduit de par la disponibilité des tiques tout en permettant l'obtention de données fiables et exploitables.

Les porcs seront élevés en groupe et bénéficieront d'un enrichissement social, ils auront à leur disposition des objets manipulables. Ils seront nourris et abreuvés à volonté. Ils feront l'objet d'un suivi clinique quotidien. En cas d'atteinte de points limite préalablement définis, les porcs seront euthanasiés.

Ce travail, outre une meilleure compréhension des facteurs de succès de la transmission vectorielle, permettra de proposer une évaluation du risque de transmission du virus de la PPA par ces tiques aux décideurs de plans de contrôle de la maladie en cas d'introduction dans une zone géographique infectée par des tiques compétentes pour la transmission.

8334 Le myélome multiple (MM) représente 10 à 15% des cancers du sang avec une incidence moyenne annuelle de 4/100.000 habitants. Ce cancer touche les personnes d'âge mur (aux environs de 65 ans). Ce cancer est caractérisé par une accumulation anormale de cellules cancéreuses dans la moelle osseuse. Les symptômes classiques comprennent une atteinte des reins, une anémie sévère, une hypercalcémie et des lésions osseuses. Cette pathologie est progressive et toujours mortelle. En dépit des différents traitements utilisés en chimiothérapie la survie des patients atteints de MM avoisine les cinq à sept années. Cependant, ce type de chimiothérapie conduit à terme à une aplasie de la moelle osseuse (myélotoxicité) associée fréquemment à des épisodes infectieux létaux qui traduisent le manque de spécificité des traitements actuels. Jusque-là, l'absence de marqueur spécifique de ces cellules plasmocytaires malignes interdisait un ciblage moléculaire efficace. Il y a donc une réelle nécessité de trouver de nouveaux médicaments qui amélioreraient la prise en charge des patients et ainsi que leur espérance de vie. Nous pourrions même envisager à moyen terme de soigner totalement cette maladie.

Nous avons récemment identifié au laboratoire un nouveau marqueur des cellules tumorales du myélome multiple. Pour cela, nous avons mis en évidence de manière très intéressante que ce marqueur se trouve surexprimé dans 30% des cellules plasmocytaires malignes issues de MO de patients atteints de MM. L'hypothèse que ce marqueur pourrait représenter un avantage sélectif dans le MM paraît tout à fait raisonnable. Pour cette raison, nous avons généré un modèle de souris génétiquement modifié afin qu'elles surexpriment ce marqueur uniquement dans la lignée cellulaire d'intérêt. De manière originale et très intéressante, nous avons montré que ces souris modifiées récapitulent avec l'âge toutes les caractéristiques du MM humain apportant la preuve que ce marqueur participe à l'établissement et/ou à la progression de la maladie.

Notre projet de recherche vise à utiliser ce modèle original et unique de souris que nous avons modifié et qui reproduit la même maladie que chez l'homme. Cette étude devrait nous permettre de mieux comprendre les causes de ce cancer afin de trouver le meilleur moyen de soigner les patients souffrants de MM. Pour cela, nous allons utiliser durant cette période de 2 ans un nombre limité et optimum de 192 souris.

Notre programme de recherche vise à utiliser ce modèle original et unique de souris modifiées qui reproduit la même maladie que chez l'homme pour mieux en comprendre les causes et trouver le meilleur moyen de soigner les patients souffrants de MM. Afin de mener à bien toutes les études en lesquelles ce programme sera décliné, il est absolument crucial que nous puissions multiplier le nombre de cellules cancéreuses obtenues chez nos souris modifiées. C'est cette étape d'amplification qui fait l'objet du présent projet. Celui-ci consistera à évaluer la qualité de l'amplification des cellules cancéreuses par transplantation de moelle osseuse de quelques souris modifiées chez de plus nombreuses souris normales. Cette étape est importante car elle permet d'obtenir beaucoup plus de tissu cancéreux en des temps beaucoup plus courts (là où il faut attendre 18 mois chez les souris modifiées, 3 mois suffisent chez les souris transplantées). Le projet nécessitera d'utiliser durant une période de 2 ans un nombre limité et optimum de 192 souris.

Afin de répondre aux différentes questions que nous nous posons, nous appliquerons le principe de la « règle des 3R » :

- Remplacement : Des tests in vitro réalisés précédemment dans notre laboratoire ont contribué à identifier notre nouveau marqueur tumoral et également de mieux comprendre sa fonction propre. En revanche, nous avons récemment démontré que notre modèle de souris est le seul qui récapitule aussi fidèlement la maladie humaine du MM. Ce modèle de souris modifié est donc unique et son utilisation dans le cadre de ce projet de recherche est indispensable. Il n'existe actuellement pas de modèles in vitro pertinents pour l'étude du MM (certes moins coûteux) récapitulant les interactions entre la niche médullaire et les cellules leucémiques et pouvant participer aux rechutes post-chimiothérapeutiques observées chez les patients.

- Réduction : Au cours de cette étude, seules les expériences absolument indispensables seront réalisées chez la souris en optimisant au maximum les méthodes employées. Quels que soient les objectifs à atteindre, nous utiliserons des lots de 12 souris afin d'obtenir des résultats interprétables. Par ailleurs, nous ferons en sorte de regrouper au maximum les conditions à tester afin de réduire au minimum le nombre d'animaux. Pour l'ensemble du projet, nous utiliserons 192 souris.

- Raffinement : depuis la publication de nos précédents résultats, nous avons amélioré la technique d'injection de cellules de moelle dans les souris immunocompétentes irradiées. En effet, l'injection intra-tibiale utilisée au préalable a été remplacée par une injection moins intrusive et moins douloureuse au niveau la veine caudale. De plus, tous les animaux utilisés pour répondre aux différents objectifs seront surveillés quotidiennement par l'expérimentateur afin d'éviter toutes douleurs, souffrance et angoisse inutiles afin de privilégier leur bien-être.

8335 Les lymphocytes T (LT) CD8 jouent un rôle primordial dans le développement de nombreuses maladies neuro-inflammatoires telles que les encéphalites virales ou les syndromes paranéoplasiques. De plus de nombreuses études ont aussi établi un lien entre la progression de la sclérose en plaque (SEP) et la présence de LT CD8 dans les lésions du système nerveux central (SNC).

Les LT CD8 dits « cytotoxiques » peuvent causer de nombreux dommages tels que la destruction de cellules gliales ou neuronales, mais inversement ils peuvent aussi contribuer à la résorption de l'inflammation de par la sécrétion de molécules régulatrices telles que l'interleukine-10 (IL-10). L'IL-10 est une molécule immunosuppressive qui joue un rôle essentiel dans le contrôle des maladies neuro-inflammatoires telles que l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE, le modèle animal de la SEP) ; et de nombreuses études cliniques chez les patients atteints de SEP suggèrent qu'il existe une forte association entre la maladie et des variations génétiques du gène codant l'IL-10.

Dans ce projet, nous utiliserons un modèle de neuro-inflammation médiée par les LT CD8 chez la souris pour identifier les mécanismes régulant la production de l'IL-10 par les LT CD8 infiltrant le SNC.

Ainsi, les résultats attendus de notre étude aideront au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques, plus ciblées et plus efficaces, contre de nombreuses maladies neuro-inflammatoires telles que la SEP, les encéphalites virales ou les syndromes paranéoplasiques dans lesquelles les LT CD8 jouent un rôle primordial.

Pour l'ensemble du projet, il est prévu d'utiliser 1647 animaux sur une période de 5 ans.

La règle des 3R sera appliquée dans le cadre de ce projet :

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

2-Réduction : les expériences sont organisées de manière à réduire au maximum le nombre d'animaux. Nous avons également pu valider certaines approches expérimentales in vitro permettant d'optimiser l'utilisation des animaux. Les résultats actuels ont permis de valider que des lots de 10 souris selon les paramètres à évaluer permettent d'acquérir des données fiables.

3-Raffinement : les souris sont hébergées dans des cages à 20-24°C et 30-50% d'hygrométrie, en portoirs ventilés (dans des cages d'une superficie de 500cm²), avec une alternance jour/nuit de 12h/12h. La nourriture et l'eau de boisson sont fournies ad libitum. Le change de la litière est réalisé 1 fois par semaine. Du coton ou du sopalin sont ajoutés pour leur permettre de faire un nid. Les animaux ont une semaine d'acclimatation avant que le protocole ne débute. Les conditions d'expérimentation font l'objet d'une procédure de suivi du bien-être animal. Les animaux seront suivis quotidiennement à l'initiation du modèle. Un animal sera euthanasié s'il présente un des points limites d'arrêt de la procédure, que nous aurons définis pour limiter la douleur, la souffrance ou l'angoisse de l'animal.

8336 Ces dernières décennies les travaux de plusieurs groupes différents ont montré que l'activité, la cognition et la fonctionnalité du cerveau diminuent avec le vieillissement. Il devient de plus en plus apparent que le dysfonctionnement cérébro-vasculaire est la cause majeure du déclin cognitif chez les personnes âgées et surtout qu'il joue un rôle majeur dans la maladie d'Alzheimer. La maladie d'Alzheimer est considérée une maladie neurodégénérative étroitement liée au vieillissement. Cette maladie est caractérisée par une perte de neurones qui entraîne une perte de mémoire et de réflexion et une diminution des capacités d'orientation dans le temps et dans l'espace. Actuellement il n'existe pas de traitement efficace pour cette maladie, mais des efforts pour diminuer ou retarder les symptômes sont déployés.

Dans ce projet nous nous intéressons au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pour la maladie d'Alzheimer, en ayant recours à la fonction des protéines endogènes. Notre hypothèse est que des molécules du rajeunissement ont la capacité d'interférer avec des maladies dues à l'âge comme la maladie d'Alzheimer. On sait que ces protéines ont le pouvoir de rajeunir le cerveau âgé en stimulant ses cellules souches neurales et en remodelant la vascularisation cérébrale. Nous allons chercher à identifier les jeunes facteurs circulants chez les jeunes organismes et les cibles dans le cerveau de ces facteurs à partir de modèles murins de la maladie d'Alzheimer. Cette démarche multi-échelle (du gène au comportement) devrait permettre de voir le jour à de nouvelles possibilités thérapeutiques.

A l'heure actuelle, il n'existe pas de méthode alternative à l'expérimentation animale pour tester les effets systémiques de nos protéines. Notre objet d'étude étant les maladies neurodégénératives liées au vieillissement, on utilise dans ces expériences des vieilles souris (15-24 mois). Cependant, il faudra comparer l'effet de ces protéines chez la vieille souris avec celui chez la jeune souris. Pour ce faire, des souris adultes de 2-3 mois seront utilisés. La réalisation de ce projet nécessitera l'utilisation de 800 souris mâles et femelles au maximum.

Ce nombre d'animaux est le minimum requis pour la réalisation des études statistiques ultérieures, qui permettront une évaluation pertinente de l'effet des différentes conditions expérimentales sur l'effet rajeunissant de ces protéines. Tous les efforts techniques seront mis en place pour minimiser au maximum toute douleur et tout inconfort de l'animal. En post-opératoire, chaque animal sera l'objet d'une surveillance quotidienne pour s'assurer de sa bonne santé. Les animaux vont recevoir un antalgique pré- et post-opératoire. Nous utiliserons une seule procédure d'un degré de sévérité sévère. Le projet impose de créer un échange du sang circulant entre les animaux qui, à tout le moins, les privent de présenter leur comportement naturel. Cependant, il existe plusieurs revues abordant le sujet de cette technique qui concluent qu'après la chirurgie, les souris opérées retrouvent leur poids pré-opératoire ; leurs profils hormonaux se normalisent, et elles commencent à construire des nids ensemble, ce qui est un indicateur de bien-être général chez la souris.

Les bénéfices attendus du projet sont de mieux comprendre d'une part le processus du vieillissement, et d'autre part essayer de trouver des thérapies spécifiques pour les maladies neurodégénératives liées au vieillissement.

8337 Chaque année, les venins (notamment celui de vipère) causent le décès de plus de 100000 personnes dans le monde. De plus, certains venins (comme celui d'abeille) contiennent des allergènes qui peuvent entraîner la production d'anticorps chez l'homme. Ces personnes sont alors 'sensibilisées' et peuvent développer des allergies parfois très graves lors d'une réexposition au même venin. De nombreux anti-venins ont été développés pour combattre les effets d'envenimations, mais, suivant le type de préparation de ces anti-venins, ceux-ci peuvent entraîner des effets secondaires. Une meilleure connaissance des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans la défense et l'allergie contre les venins, ainsi qu'une meilleure connaissance des effets des anti-venins pourraient ouvrir la voie vers de nouvelles thérapies pour traiter les envenimations.

Ce projet de recherche fondamentale va permettre de définir le rôle de certaines cellules immunitaires et d'anticorps dans l'allergie et la défense contre les venins d'abeille et de vipère, ainsi que les effets d'anticorps présents dans un anti-venin de vipère sur le système immunitaire.

L'espèce utilisée pour ce projet de recherche est la souris de laboratoire. Nous estimons devoir utiliser 1161 souris sur les 5 années que durera ce projet. Il a été établi que de nombreuses propriétés des populations de biomolécules et de cellules du système immunitaire sont communes à la souris et à l'homme. De plus, nous allons utiliser des souris 'humanisées', c'est-à-dire génétiquement modifiées pour exprimer des anticorps humains ou des récepteurs humains à ces anticorps. L'utilisation de souris 'humanisées' permettra d'assurer que nos résultats expérimentaux sont transférables aux humains.

Les bénéfices attendus du projet sont une meilleure compréhension du rôle de certaines cellules immunitaires (mastocytes et neutrophiles) dans la défense contre les venins de vipère, et du rôle et mécanisme d'action des anticorps de type IgE et IgG dans la défense contre le venin d'abeille et dans les effets protecteurs d'un anti-venin de vipère.

Ce projet comporte trois procédures de classe sévère, En effet, l'injection de venin chez la souris induit une forte réponse inflammatoire avec des dommages tissulaires qui sont à évaluer et à l'évaluation de laquelle nous contribuerons. Nous utiliserons des analgésiques tout au long de cette procédure pour réduire la douleur. Pour que notre projet soit un modèle préclinique pertinent et avec le minimum d'inconfort/de souffrance pour les souris de laboratoire, nous nous sommes imposés comme contrainte la mise en œuvre d'analyses in vivo avec des fenêtres temporelles les plus courtes possibles. Les venins entraînent des réponses toxiques et immunitaires complexes impliquant de nombreux tissus et organes, et de ce fait, nos études in vivo ne peuvent pas être remplacées par des

modèles in vitro. Le recours à des lignées consanguines de souris nous permettra entre autres de réduire le nombre d'animaux par groupe expérimental.

8338 Lors de la réplication, les virus à ARN génèrent des erreurs, certaines donnant naissance à des génomes défectifs, qui constituent des particules défectives interférentes (DIP). Des études en culture cellulaire ont démontré que l'infection virale est atténuée lorsque la proportion de DIP est élevée. Des génomes défectifs produits et encapsidés in vitro seront donc susceptibles d'interférer avec le virus entier après administration chez l'individu - ce qui constituerait une nouvelle approche antivirale.

Le recours à l'animal est nécessaire afin de déterminer si cette approche, qui est prometteuse en culture cellulaire, peut protéger contre l'infection. Il serait également nécessaire de déterminer les conditions d'administration idéales pour avoir l'effet antiviral désiré - la dose, la voie d'administration, le temps de traitement. Ceci dit, l'animal est remplacé dans la mesure où les 10 à 20 DIPs présélectionnés seront évalués principalement en culture cellulaire en termes d'efficacité antivirale. Cette approche nous permettra de réduire le nombre total de DIPs (maximum de 5 DIPs) à tester in vivo. Seules les DIPs les plus performantes en culture cellulaire seront caractérisées chez l'animal. Les expériences seront réalisées sur des souris femelles ou mâles âgées de 3 semaines. Un maximum de 860 souris AG129 sera nécessaire sur une durée de 5 ans. Nos analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 5 pour chacune des procédures expérimentales avec 3 temps d'analyse (3, 5 et 7 jours post-infection). En tout, 4 procédures expérimentales seront réalisées, qui seront répétées un maximum de trois fois et dont le degré de sévérité est léger. Si une procédure expérimentale ne donne pas de résultat statistiquement significatif, l'expérience ne sera pas répétée.

Nous allons étudier l'innocuité du traitement (administration des DIPs sans infection) et l'effet antiviral des DIPs contre l'infection par les entérovirus, causes majeures de neuropathologies virales surtout chez l'enfant. Nous utilisons un modèle murin bien caractérisé. La seule source de souffrance éventuelle dans nos expériences est liée à l'infection des souris par des Entérovirus. En fait, l'infection est asymptomatique pendant les sept premiers jours. Il n'est pas nécessaire d'attendre que l'infection devienne symptomatique (début de paralysie à partir du 10ème jour), car la charge virale maximale est atteinte à 5 jours après infection, avant que les symptômes ne s'installent. Afin de réduire le risque de souffrance, nous allons réaliser uniquement des infections sous-létales, qui ne devront occasionner aucun symptôme et qui ne devront pas amener à la paralysie. Cependant, si nous constatons le début de symptômes, très peu probable avec des animaux conservés seulement 7 jours et lors d'une infection sous-létale, la souris sera euthanasiée. L'effet protecteur des DIPs sera évalué avant 7 jours post-infection, ce qui nous permet de limiter encore le risque de souffrance pour l'animal. Les souris seront suivies quotidiennement pendant les 7 jours d'infection pour vérifier le bien-être de l'animal et s'assurer que le point limite (début de symptômes) ne soit pas atteint. Les souris seront euthanasiées avant le prélèvement d'organes pour déterminer la charge virale.

8339 Ce projet a pour but d'étudier comment le stress est géré au niveau du cerveau en se concentrant sur un réseau de structures impliquées dans la réponse au stress. Lors de cette étude il s'agira d'effectuer soit des enregistrements de l'activité électrique de ces régions, soit de mesurer la libération de neurotransmetteurs dans le cortex préfrontal, durant un stress répété, afin d'étudier les conséquences de ce dernier sur la communication entre les structures, ou sur les modulations neurochimiques inhérentes. Nous nous intéresserons plus particulièrement à une région, l'habénula latérale, dont nous étudierons le rôle dans la gestion du stress en pratiquant son inactivation sélective à l'aide de la technique pharmacogénétique (DREADD). Pour cela, sous anesthésie générale, la construction virale permettant l'inactivation ultérieure de l'habénula latérale (chez l'animal vigile) sera micro-injectée dans l'habénula latérale; dans un même temps des électrodes d'enregistrement seront implantées dans les structures d'intérêt (cortex préfrontal, hippocampe, amygdale, système dopaminergique, système sérotoninergique) pour les expériences d'électrophysiologie, ou un guide canule de microdialyse sera implanté dans le cortex préfrontal pour l'expérience de détection neurochimique.

Les situations stressantes auxquelles nous exposerons nos animaux sont des situations de référence lorsque l'on étudie la réponse d'un rongeur face au stress : le champ ouvert et la procédure de maintien léger. Lors de celles-ci, nous pourrions analyser les paramètres électro-physiologiques et

neurochimiques en fonction des différentes réponses comportementales des rats. Le projet nécessitera 120 rats.

Règle des 3R. Réduction : le nombre d'animaux par groupe est calculé au plus juste des prérequis statistiques, ces dernières étant effectuées à l'aide de statistiques paramétriques; de plus, dans le souci de la réduction les rats seront testés lors de deux procédures expérimentales (2 et 3). Raffinement : le choix des tests a été guidé par leur validité dans le domaine et le choix de l'espèce - Rat - par son adaptation naturelle à réaliser ces tests; tout sera mis en œuvre pour préserver le bien-être des animaux lors de la procédure chirurgicale réalisée sous anesthésie générale (couverture chauffante, administration d'un analgésique local, d'un antidouleur et d'un antibiotique) et lors de la phase de récupération post-chirurgicale (suivi post-opératoire régulier). Remplacement : dans la mesure où il s'agit ici d'étudier la communication au sein d'un réseau cérébral lors de l'accomplissement de tests comportementaux explorant la gestion du stress, il n'est pas possible de recourir à d'autres modèles.

8340 L'objectif des recherches de notre laboratoire est de mettre en place des stratégies thérapeutiques pour traiter les dystrophies musculaires progressives, en particulier la dystrophie musculaire de Duchenne et les dystrophies musculaires des ceintures (LGMD pour Limb Girdle Muscular Dystrophies). Ces myopathies touchent environ 1 garçon sur 3500 pour la dystrophie de Duchenne et 1 personne sur 50 000 pour les LGMD. Elles sont progressivement invalidantes et conduisent à la perte de la marche. Aucun traitement curatif n'est actuellement disponible pour ces myopathies d'origine génétique.

Une composante importante du processus dystrophique sont les cycles de dégénérescence/régénération des fibres musculaires. Au cours du temps, l'efficacité de régénération s'épuise et le tissu musculaire dégénère progressivement. Cette efficacité décroissante conduit à une atrophie musculaire et donc à un handicap fonctionnel. Cette perte d'efficacité se voit également au cours de l'âge chez la personne normale et participe au phénomène de sarcopénie.

Le but de ce projet est d'évaluer l'effet de différents traitements thérapeutiques agissant spécifiquement sur la composante régénération à différents temps du processus régénératif. Pour cela, nous utiliserons i) des molécules pharmacologiques telles que les inhibiteurs de myostatine, des anti-inflammatoires ou des anti-fibrotiques, ii) des gènes portés par des vecteurs viraux (AAV, lentivirus) ou non viraux (plasmides) exprimant des facteurs contrôlés par la voie de signalisation dépendant de la myostatine ou jouant sur l'inflammation et la fibrose a, iii) des vésicules de type exosome ou encore iv) des cellules souches adultes dérivées du muscle sain ayant des propriétés de colonisation du muscle. L'effet thérapeutique de ces traitements aura été testé auparavant sur des modèles cellulaires ou dans des études précédentes.

Pour induire un contexte de régénération tissulaire dans le muscle de façon isolée par rapport aux autres composants du processus dystrophique, nous souhaitons utiliser un traitement biochimique (dérivé de venin de serpent), conduisant à la lyse des membranes des fibres musculaires, le forçant à se régénérer. Cette lyse n'entraîne pas de phénotype dommageable.

Réduction : Cette étude sera réalisée dans des souris saines (WT) dans un souci de réduction. En effet, ce modèle, contrairement aux modèles dystrophiques, nous permettra d'harmoniser et de contrôler le processus régénératif entraînant une réduction de la variabilité et donc une puissance accrue du test statistique pour un nombre réduit d'animaux. L'utilisation d'un groupe d'animaux ne recevant aucun traitement sera utilisée en tant que contrôle pour l'ensemble des procédures, permettant, ici encore, de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Les risques de douleur et de stress induits par les actes expérimentaux seront gérés par l'utilisation de modalités d'anesthésie et d'analgésie adaptées. De plus, l'environnement primaire des animaux sera enrichi par l'ajout d'éléments spatiaux tels que igloos et Aspen bricks.

Remplacement : Les études de régénération du muscle ne peuvent se faire qu'in vivo, ce qui ne permet pas de remplacer.

Dans ce projet, nous estimons que 220 animaux seront utilisés. Ce nombre est estimé en fonction de nos connaissances actuelles sur ce type d'études ainsi que sur un calcul de taille d'échantillon permettant une analyse statistique des résultats.

8341 Les cancers du cortex surrénalien sont des maladies rares mais très agressives et se présentent chez les enfants tout comme chez les adultes. Ces cancers présentent une occurrence variable suivant le sexe. Ainsi les femmes sont plus concernées (55%) que les hommes (45%) sans que cela ne soit pour autant expliqué et/ou compris.

Une caractéristique remarquable de la glande surrénale est sa capacité à se régénérer en permanence chez l'adulte et donc à conserver des cellules souches capables de se diviser et de se différencier pour remplacer les cellules du cortex surrénalien mortes. Ce phénomène d'homéostasie se produit au niveau de la partie extérieure de l'organe et est en équilibre avec une mort cellulaire programmée au centre de la glande surrénale. En résumé, les cellules prolifèrent, se différencient, migrent vers le centre et meurent pour laisser place à de nouvelles cellules et ce en continue.

Une étude statistique a mis en évidence la différence de taille des glandes surrénales chez la souris en fonction du sexe de l'animal. Ainsi, à partir de 3 semaines d'âge et jusqu'à la fin de leur vie, les glandes surrénales des femelles sont plus grosses que celles des mâles. Il y a donc une différence de la glande surrénale entre les sexes.

Malgré plusieurs études, l'identification des cellules souches (cellules immatures capables de se diviser) du cortex surrénalien ainsi que les mécanismes requis pour leur prolifération et leur activation sont mal connus. Dans notre laboratoire, nous étudions le renouvellement de la glande surrénale afin d'identifier quelles sont les cellules souches et comment celles-ci contribuent à la régénération de cette glande. Nous essayons également de comprendre ce qui influence la taille de l'organe suivant que l'on soit femme ou homme et si la taille et le renouvellement sont en lien avec la prévalence des cancers surrénaux.

Pour cela, nous souhaitons réaliser chez des souris adultes une gonadectomie. Cette chirurgie consiste à retirer les ovaires chez les femelles et les testicules chez les mâles. Cette expérience nous permettra d'arrêter la sécrétion d'hormones sexuelles normalement produites par les gonades femelles ou mâles et ainsi de comprendre le rôle de ces hormones sexuelles sur la glande surrénale. Ainsi nous pourrons comparer l'effet des hormones féminines ou masculines sur la prolifération cellulaire et le recrutement des cellules souches. Afin de garantir un bien être optimal des animaux, ces derniers seront régulièrement surveillés.

Dans le but de réduire le nombre de souris utilisées, nous avons effectué des calculs statistiques pour déterminer le nombre minimal mais suffisant pour avoir des résultats significatifs. De plus, plusieurs analyses seront effectuées sur les mêmes échantillons afin de limiter le nombre d'animaux requis (Réduction).

En ce qui concerne le raffinement, l'usage d'anesthésiant et analgésiant lors de l'opération et en post-opératoire permettra de minimiser la souffrance animale. De plus, les souris seront surveillées suivant des grilles d'évaluations afin de leur éviter toute souffrance grâce à des points limites adaptés et précoces qui ont été déterminés en accord avec la réglementation européenne (Raffinement).

Enfin, comme nous cherchons à comprendre le fonctionnement de l'organe dans son ensemble et dans son environnement physiologique, il est indispensable pour notre recherche d'utiliser un modèle animale (Remplacement). Il n'existe pas à ce jour de système de génération in vitro de glandes surrénales fonctionnelles capables de sécréter et moduler la production d'hormones en fonction de stimuli extérieurs comme c'est le cas chez un organisme vivant.

Au total, 208 souris seront utilisées dans ce projet.

8342 Administratives et Réglementaires

En élevage porcin, les traitements antibiotiques sont fréquents afin d'enrayer les diarrhées colibacillaires apparaissant après le sevrage des animaux. L'un des antibiotiques les plus fréquemment utilisés est la colistine. Jusqu'à la fin de l'année 2015, la résistance à la colistine paraissait relativement rare pour les Entérobactéries d'origine animale ou humaine. Depuis 2015, plusieurs gènes de résistance mcr, transférables entre souches, portés par des plasmides, ont été décrits et sont présents dans de nombreux pays, sur des souches d'origine animale ou humaine. L'existence de souches multi-résistantes, et en particulier résistantes à la colistine, réduit les options thérapeutiques. De plus, cette résistance transférable a conduit à classer la colistine parmi les antibiotiques critiques dans certains pays. Il est donc nécessaire de trouver de nouvelles solutions

thérapeutiques tout en réduisant les quantités de colistine utilisées en élevage. Les bactériocines (substances antimicrobiennes produites par des bactéries) figurent parmi les nouvelles solutions thérapeutiques. L'objectif de ce projet est de mettre au point un modèle d'infection ou de colonisation de porcs avec différentes souches de *E. coli* multi-résistantes, qui nous permettra à l'avenir de tester l'efficacité de différentes bactériocines vis-à-vis de la colonisation par les *E. coli* multi-résistants.

La procédure sera conduite en animaleries protégées sur un total de 32 porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiés, de 6 semaines d'âge : Les porcs seront inoculés ou non, par voie orale, avec une souche de *E. coli* multi-résistante. Les animaux seront observés à minima quotidiennement pour observer les éventuels symptômes. Des prélèvements de matières fécales seront collectés régulièrement. Les résultats permettront de choisir, en fonction des symptômes observés et des résultats d'analyses des prélèvements fécaux, la souche qui sera utilisée pour de futurs essais.

Ces résultats ne peuvent être obtenus que par expérimentation sur l'espèce cible. Le protocole expérimental peut entraîner de la souffrance animale, car les souches utilisées possèdent certains facteurs de virulence : les animaux pourront présenter, dans la pire des situations, de la diarrhée, des vomissements et une déshydratation. En cas d'atteinte du point limité fixé : non-réponse aux stimuli tactiles et visuels et pertes d'appétit et de poids importantes, les porcs seront euthanasiés. Dans un but de réduction, compte tenu de notre expérience, le nombre d'animaux est calculé de manière à obtenir des résultats significatifs en utilisant un minimum d'animaux par lot. Les inoculations sont faites par voie orale. Les animaux sont vus au moins une fois par jour ; ils sont élevés en groupe, disposent d'objets manipulables, ont accès à l'alimentation et à de l'eau à volonté, ont de la lumière de 7 h 30 à 18 h 00 et disposent de lampes chauffantes ainsi que des plaques de couchage. Ils sont pesés chaque semaine et leur température est mesurée chaque jour, afin de surveiller leur état de santé. Afin de réduire le stress des animaux, les prélèvements sont collectés lors des prises de température. Enfin, des prélèvements d'organe seront effectués sur les animaux après leur euthanasie en fin d'essai.

8343 Le mélanome est le cancer qui cible les cellules de la peau qui fabriquent de la mélanine, le pigment qui colore la peau et la protège des méfaits des rayons UV. Une des particularités du mélanome par rapport aux autres cancers cutanés est son aptitude à envahir les tissus au-delà de la peau (muscles, ganglions) et à aller se greffer dans les organes distants (Foie, Poumon, Cerveau).

Ce projet a pour but d'étudier le rôle d'une protéine qui interagit avec les récepteurs de la matrice extracellulaire et qui régule le métabolisme dans le lignage mélanocytaire et le développement des mélanomes. Notre protéine d'intérêt régule des signaux différents émanant soit de l'environnement extracellulaire matriciel dont le rôle est crucial au cours de la progression tumorale, soit des signaux métaboliques qui sont essentiels pour la prolifération cellulaire. Cette protéine représente donc un modèle de choix pour explorer de nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement du mélanome. Afin de réaliser cette étude, nous utiliserons des modèles murins qui ciblent le lignage mélanocytaire et qui reposent sur des mutations géniques spécifiques décrites dans les pathologies humaines. Nous utiliserons 2 modèles distincts porteurs de mutations géniques différentes qui permettent de mimer la pathologie humaine. De par leur complémentarité, nous aurons une vision plus globale du rôle de notre protéine d'intérêt dans le développement de la pathologie.

Ce projet nous permettra d'évaluer la contribution des signaux émanant de l'environnement matriciel ainsi que des signaux métaboliques dans le développement du mélanome et ce à différents stades d'évolution de la pathologie. Le but étant de proposer de nouvelles pistes d'exploration thérapeutique selon l'étape initiation, progression, métastase au cours de laquelle le rôle de notre protéine d'intérêt se révélera crucial. Ce projet implique des procédures d'induction de tumeurs afin de mieux appréhender la complexité de ces pathologies et d'ainsi pouvoir proposer de nouvelles pistes thérapeutiques.

En termes de remplacement, aussi souvent que possible, les expériences seront réalisées in vitro sur des cellules en culture. Cependant, la complexité de la peau, de par la présence de nombreux types cellulaires d'origine embryonnaire différente, rend la reconstitution d'un environnement complet très difficile, c'est pour cela qu'il est essentiel de réaliser des expériences sur les souris. Nous avons choisi d'utiliser des modèles murins car les animaux transgéniques sont facilement disponibles et sont les plus couramment utilisés en laboratoire. En termes de réduction, le nombre d'animaux utilisés dans

ce projet a été déterminé par l'utilisation de statistiques prédictives afin d'obtenir des résultats statistiquement significatifs à partir d'un nombre minimum d'animaux. En termes de raffinement, nous utilisons des modèles inductibles qui permettent de diminuer le stress et la souffrance des animaux. Cependant, certains modèles de ce projet vont développer des phénotypes dommageables, un suivi sanitaire quotidien sera réalisé afin de minimiser le stress et la souffrance et des points limites ont été définis.

Le nombre total d'animaux impliqués dans ce projet est 600.

8344 La maladie d'Alzheimer, une maladie neurodégénérative incurable liée à l'âge, débute 10 à 15 ans avant d'être diagnostiquée faute de marqueurs diagnostiques précoces. Le diagnostic tardif conditionne la mise en place de traitements à des stades de maladie où la pathologie est déjà irréversible. Or, la longue phase pré-symptomatique (préclinique) de la maladie ouvre une fenêtre thérapeutique pendant laquelle les traitements pourraient être plus

efficace. La recherche de biomarqueurs diagnostic du stade pré-symptomatique est donc devenue une des priorités de santé publique au niveau mondial à cause du vieillissement des populations. Les déficits de vision sont nombreux dans la maladie d'Alzheimer et les altérations histopathologiques caractéristiques de stades avancés de la maladie sont similaires dans la rétine et dans le cerveau. Du point de vue anatomique et développemental, la rétine fait partie du cerveau mais contrairement à ce dernier, elle est bien plus accessible aux explorations non-invasives grâce à la transparence de l'œil. Nous rechercherons si les altérations subtiles de phénotype et de fonctionnement de cellules gliales et neuronales de la rétine y seraient détectables avant de l'être dans le cerveau.

Pour ce faire, nous utiliserons comme modèle une souris transgénique APP/PS1Ed9 qui porte deux mutations. Une des mutations concerne la protéine précurseur de l'amyloïde-beta (APP), et l'autre la sous-unité 1 de la présénile (PS1), l'enzyme impliqué dans le clivage terminal de l'APP en l'amyloïde-beta.

Notre hypothèse est que cette activation gliale se produit même avant l'accumulation significative de l'amyloïde-beta.

Le total estimé de souris à utiliser durant les 5 années est de 200 souris, donc 40 souris par an. Ce nombre est relativement élevé car il est indispensable d'étudier les 2 sexes séparément (en moyenne 20 souris par an pour chaque sexe, avec 20 souris transgéniques et 20 souris contrôles de souche sauvage par an pour chaque sexe). Nous avons respecté strictement le principe de 3R (Remplacement, Réduction, Raffinement) afin de réduire le nombre de souris à ce minimum.

L'objectif du projet implique l'utilisation d'animaux car la question des performances visuelles ne peut être étudiée in vitro.

Les souris seront examinées quotidiennement par les expérimentateurs et/ou le personnel qualifié des animaleries. Les animaux sont hébergés dans les conditions conformes à la réglementation. Les rongeurs bénéficieront d'une anesthésie générale fixe ou gazeuse selon les procédures expérimentales et d'une anesthésie cornéenne pour les électrorétinogrammes. Une observation quotidienne des animaux sera effectuée pour s'assurer du bien-être des animaux.

Le nombre d'animaux utilisé est le minimum requis pour atteindre l'objectif scientifique fixé ci-dessus en respect du principe de remplacement, de réduction et de raffinement décrits au 2° de l'article R214-105 « règle des 3R ». Les études préalables in vitro ont déjà été effectuées.

Plus généralement, nous réaliserons une veille bibliographique afin de s'assurer que les expériences envisagées n'ont pas été publiées dans la littérature scientifique. De plus, afin de limiter le nombre d'animaux, nous utiliserons un groupe contrôle commun aux expérimentations (sans traitement) et nous validerons, si les résultats sont cohérents entre eux, les données par une analyse statistique. Enfin, si notre hypothèse de départ pour l'une ou l'autre des analyses envisagées n'est pas validée par les résultats, celle-ci sera immédiatement arrêtée.

8345 La maladie d'Alzheimer est caractérisée par une dégradation progressive des facultés mnésiques et cognitives. Au niveau physiopathologique il existe une altération des connexions entre les différentes régions cérébrales, notamment entre l'hippocampe et le cortex préfrontal.

A partir d'outils électro-physiologiques, notre objectif est d'analyser finement d'un point de vue fondamental, chez la souris éveillée et libre de ses mouvements, l'interaction et la communication, au niveau cellulaire mais aussi à un niveau plus intégré, entre différentes dynamiques spatio-temporelles :

- i. Celle des patrons de décharges de circuits neuronaux corticaux.
- ii. Celle des activités électriques engendrées et véhiculées entre des structures cérébrales impliquées dans des oscillations électro-encéphalographiques (EEG), lesquelles sont associées à divers états de conscience, physiologiques et pathologiques.

Ces études seront réalisées chez 2 modèles expérimentaux de troubles cognitifs :

- Un modèle transgénique : des souris génétiquement modifiées surexprimant une mutation humaine de la préséniline 1 (PS1 KI/KI) à l'origine de formes familiales rares et précoces de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme

- un modèle pharmacologique : souris C57BL6 traitées à la scopolamine

Nous procéderons à l'analyse spectrale des EEG du cortex préfrontal et du cortex hippocampique (Transformée de Fourier : FFT), à l'évaluation statistique du degré de linéarité de leurs relations chronologiques (Fonction de cohérence) et du lien temporel avec les champs de potentiels électriques locaux dans certains tests comportementaux tels que le labyrinthe en T, le labyrinthe en Y ou la reconnaissance d'objets nouveaux.

L'étude des relations électro-physiologiques entre l'hippocampe et le cortex préfrontal ne peut être réalisée que sur un animal, non anesthésié, dans un état de vigilance et comportemental précis. Un modèle expérimental de remplacement n'est pas envisageable. Le développement de méthodes de traitement des signaux très sophistiquées (Transformée de Fourier et fonction de cohérence pour les champs de potentiel, algorithme de classification pour les activités unitaires) ainsi que l'analyse statistique multi-variables des résultats ont permis de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à la réalisation de ces études. L'anesthésie générale lors de la mise en place des électrodes, la procédure d'euthanasie dans une pièce dédiée à cet objectif, ainsi qu'une procédure quotidienne d'observation et d'examen, sont les pratiques expérimentales destinées à réduire au maximum la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés dans ce projet. Au total 514 souris seront utilisées pour ce projet.

8346 Les vecteurs lentiviraux (VL) sont des vecteurs de transfert de gènes strictement non-répliquatif et n'exprimant aucun gène du virus parental, généralement le VIH-1 (Virus de l'Immunodéficience humaine 1). Ces vecteurs sont très largement utilisés en recherche biologique. Ils sont aussi à la base de nombreux essais cliniques de thérapie génique chez l'homme, avec succès et sans effets secondaires. Leur innocuité est donc largement démontrée.

De plus, ces vecteurs sont particulièrement efficaces dans l'induction de réponses immunitaires et constituent des outils d'intérêt dans le développement de stratégies vaccinales. En effet, les VL permettent l'expression d'un gène vaccinal dans des cellules du système immunitaire telles que les cellules dendritiques qui sont des acteurs clés dans la mise en place d'une réponse immunitaire. Malgré le potentiel prometteur des VL, la production des particules vecteurs est lourde, coûteuse et difficilement compatible avec une production industrielle à grande échelle, requise dans le cas d'une campagne de vaccination de masse. En effet, une production de VL nécessite d'introduire trois ADN différents dans une cellule, de purifier et de conserver le VL ainsi obtenu à - 80°C avant de pouvoir l'injecter. Il faut également s'assurer de la pureté du VL produit et notamment de l'absence de contaminants ADN plasmidiques et cellulaires. Ces étapes de purification extensives sont très coûteuses en termes de rendement de production.

L'objectif de ce projet est donc de proposer une technique alternative de délivrance in vivo des vecteurs lentiviraux. Le but est de faire produire par l'individu son propre vaccin qui induira une réponse immunitaire protectrice. La réponse immunitaire générée par cette technique ne peut être évaluée que dans un organisme vivant. La technique envisagée consiste à faire produire le VL porteur d'un gène vaccinal par l'organisme vivant lui-même (in vivo), en lui injectant directement les ADN nécessaires à sa production, par la voie intramusculaire, exactement à l'image d'un vaccin ADN nu. Les vaccins à base d'ADN présentent non seulement l'avantage d'avoir un coût de production faible

comparé à la production de VL, mais également d'avoir une grande flexibilité du point de vue de l'interchangeabilité des gènes vaccinaux pouvant être produits. De plus, l'ADN est stable à température ambiante ce qui facilite les conditions de conservation et de distribution des vaccins notamment dans les pays du sud. Avant d'envisager son utilisation chez l'homme, nous devons d'abord établir la faisabilité de cette technique dans un organisme vivant en caractérisant les réponses immunitaires induites de cette manière. La production de VL n'est pas réalisable chez la souris car les cellules murines sont incapables de générer des particules lentivirales. En revanche, le rat ne présente pas cette barrière physiologique. Par conséquent, nous utiliserons ce modèle animal dans le projet. Les groupes seront constitués d'un minimum de 3 à 5 rats adultes femelles afin d'éviter la variabilité inter-sexe. Ces effectifs permettront d'obtenir des différences significatives lors de l'utilisation de tests statistiques de type Anova et de garantir donc les résultats obtenus.

Une première procédure expérimentale de sévérité légère consistera à tester l'immunogénicité d'un VL exprimant un antigène unique (VL modèle) chez le rat, c'est-à-dire sa capacité à être reconnu par le système immunitaire et à induire une réponse immunitaire. Il nous permettra de valider le choix de l'antigène véhiculé par le VL qui nous servira ensuite de référence dans les procédures suivantes et limitera ainsi le nombre de rats à injecter dans les procédures suivantes.

Une deuxième procédure de sévérité légère permettra de déterminer la quantité d'ADN nécessaire à injecter pour obtenir une production de VL capables d'induire la meilleure réponse immunitaire possible. Cette procédure comportera 2 expériences : une première pour définir et valider la quantité minimale d'ADN à injecter pour obtenir une réponse, une deuxième pour affiner cette dose.

En cas d'obtention d'une réponse immunitaire induite par l'immunisation ADN, il sera nécessaire de comparer cette réponse induite par des VL produits in vivo à celle induite par l'immunisation avec des VL produits in vitro. En effet, comparer l'efficacité de ce nouveau concept de production de VL aux actuelles techniques de production permettra de mesurer la portée de ce projet et d'envisager d'éventuelles optimisations. Le VL et la quantité d'ADN optimale à utiliser ayant été définis par les procédures 1 et 2, cela permettra de réduire le nombre de rats à immuniser lors de la troisième procédure. Durant cette dernière procédure expérimentale, de sévérité légère, la réponse immunitaire induite dans un groupe de rats immunisé avec la dose d'ADN optimale sera comparée à celles induites par différentes doses de VL.

Les injections de VL et d'ADN seront effectuées par voie intramusculaire qui est plus douloureuse que la voie intrapéritonéale. Pour limiter cette douleur et le stress qui en découlerait, ces injections intramusculaires seront donc effectuées sous anesthésie. Après injection, ils seront surveillés jusqu'à leur réveil et ensuite suivis quotidiennement afin de détecter tout signe éventuel de souffrance. Nous estimons à 108 le nombre de rats nécessaire à la réalisation de ce projet et ce, sur une durée de 5 ans.

En conclusion, ce projet a pour objectif de pallier aux étapes de production industrielle de VL difficilement adaptables lors d'une vaccination à grande échelle.

8347 Les protéines purifiées du plasma humain (immunoglobulines polyvalentes, facteurs de coagulation, fibrinogène et albumine) ou recombinantes (protéines produites en laboratoire à partir de cellules ou d'animaux génétiquement modifiées) permettent le traitement de pathologies graves et rares comme les déficits immunitaires primitifs ou acquis, et les hémophilies (déficiences en facteur de la coagulation). Comme tout médicament, leur administration peut entraîner l'apparition d'effets indésirables. L'un d'eux est l'excès de coagulation, voire la survenue d'un événement thromboembolique.

L'objectif de ce projet est d'évaluer in vivo l'activité thrombogène, provoquant la formation d'un caillot de sang, de médicaments commercialisés ou en cours de développement pharmaceutique dans un modèle de lapin. Le modèle de Wessler chez le lapin est le modèle le plus couramment utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour caractériser le potentiel thrombogène de nombreux médicaments dérivés du plasma (fibrinogène, immunoglobulines, facteurs de la coagulation). Plus important, ce modèle a démontré sa prédictivité et sa sensibilité. Le choix du lapin a été confirmé par la mise en évidence de l'activité pharmacologique de nos produits dans cette espèce. Aucune autre méthode de remplacement in vitro reconnue par les autorités n'existe actuellement.

La procédure expérimentale consiste à administrer par voie intraveineuse (iv) le produit chez l'animal anesthésié et à observer quelques minutes plus tard la formation ou l'absence de thrombus au niveau des veines jugulaires afin de déterminer une dose thrombogène.

L'activité thrombogène ou dose thrombogène est évaluée à l'aide du pourcentage de segments thrombosés prenant en compte :

- la présence ou l'absence de thrombus dans les segments veineux (segments thrombosés),
- et la taille des thrombus (score Wessler).

Les animaux utilisés sont spécialement élevés à des fins scientifiques dans des établissements agréés. Ce projet prévu sur 5 ans nécessitera 630 animaux au maximum. Ce nombre a été déterminé grâce aux données historiques obtenues au sein de notre laboratoire sur plus de 25 ans. Il permettra ainsi l'obtention de résultats fiables et exploitables. Les animaux sont hébergés selon les règles de bien être en vigueur dans l'animalerie. Les méthodes expérimentales ont été choisies afin d'éviter toute souffrance lors de leur mise en œuvre (administration de myorelaxant et anesthésie générale). L'application de critères d'arrêt (poil hérissé, troubles respiratoires et nez qui coule) et le suivi quotidien des animaux hébergés permettent de garantir leur bien-être. L'état de santé des animaux sera surveillé (état général) tout au long de l'expérience, ce qui nous permettra d'intervenir immédiatement et de manière appropriée dès le moindre signe de souffrance. Dans ce cas, le vétérinaire de l'installation sera alerté afin de mettre en œuvre des traitements appropriés ou de procéder à une euthanasie.

8348 Les modes d'alimentation excédentaire et déficitaire sont des problèmes importants que l'on retrouve au niveau mondial. Ils sont englobés dans le terme malnutrition. Alors que l'obésité (et les maladies associées) nuisent aux pays développés, la sous-alimentation persiste dans le monde entier. Ces deux conditions conduisent à un état d'immunité altérée qui peut faire apparaître des réponses immunitaires anormales lors de l'exposition aux agents pathogènes. Beaucoup de virus émergents provoquant des épidémies foudroyantes sont transmis par les arthropodes (arbovirus). La compréhension du rôle de la malnutrition dans l'infection par ces agents pathogènes et de sa contribution à la propagation épidémique est essentielle à la santé publique pour lutter contre ces épidémies.

Des expériences seront effectuées avec des souris femelles à partir de 3 à 4 semaines et qui suivront un protocole d'alimentation spécifique sur une période de 6 semaines. Un maximum de 982 souris femelles C57BL/6 sera nécessaire sur une durée de 5 ans. En tout, 5 procédures expérimentales seront réalisées, qui seront répétées au maximum trois fois, et dont le degré de sévérité sera modéré.

Nous étudierons l'effet de l'état nutritionnel sur le déroulement de l'infection virale, la réplication virale et l'évolution/adaptation du virus, pour les virus chikungunya (CHIKV) et Zika (ZIKV). L'infection de souris C57BL/6 par le virus chikungunya ne cause pas de symptômes au-delà d'une inflammation transitoire de deux ou trois jours au niveau du site d'injection. Les souris C57BL/6 ne sont pas susceptibles à l'infection par ZIKV, cependant, lorsqu'elles reçoivent des anticorps bloquant une réponse immunitaire robuste, elles développent une virémie transitoire qui peut être surveillée. Les anticorps sont spécifiques au récepteur à l'interféron (une pièce importante du système immunitaire), qui est nécessaire pour bloquer l'infection des virus. Aucun symptôme n'est observé chez ces souris après une infection par ZIKV. Les souris seront suivies deux fois par jour durant l'infection. Pour les deux virus, nous utiliserons des modèles de souris bien caractérisés.

Pour notre étude, nous allons utiliser le principe des 3 R de bioéthique : Remplacer, Réduire, et Raffiner. Remplacer – L'expérimentation avec les animaux est nécessaire pour reproduire le phénotype naturel associé à la malnutrition de l'homme. Les modèles in vitro ne peuvent pas recréer les réseaux complexes entre les différentes cellules d'un corps vivant et leurs interactions avec les nutriments, les hormones et les infections virales qui s'en suivent. Réduire – Nos analyses statistiques nous permettent de limiter le nombre de souris à 7 pour chaque groupe expérimental. Nous avons utilisé des expériences antérieures pour estimer l'écart type pour ensuite estimer le nombre d'animaux nécessaires pour ces études. Raffiner –Le virus ZIKV ne produit aucun symptôme chez ces souris et le virus CHIKV produit uniquement une inflammation transitoire au site d'injection. Nous allons suivre les souris deux fois par jour durant l'infection.

8349 Chez les mammifères, la croissance et la différenciation des ovaires débutent pendant la vie du fœtus et se poursuivent jusqu'à la puberté. Ces phénomènes sont régulés au niveau des ovaires par des signaux locaux, entre cellules, ainsi que par des signaux à distance relayés par des hormones apportées par la circulation sanguine. L'objectif de nos travaux est de mieux comprendre ces régulations, qui, malgré de nombreux travaux, sont encore insuffisamment connues pour permettre l'amélioration de l'efficacité de la reproduction dans le domaine agronomique ou la prise en charge des anomalies du fonctionnement ovarien chez la femme.

Dans ce but, nous développons des modèles de lapins génétiquement modifiés (GM). La demande d'autorisation concerne la mise en place d'un protocole expérimental de traitement hormonal de ces animaux GM après leur naissance pour analyser la réponse des ovaires à ce traitement. Différentes lignées de lapins GM seront ainsi analysées. Plus précisément, nous analyserons si le traitement hormonal peut modifier la croissance des follicules ovariens (structures de l'ovaire au sein desquelles se produit la différenciation des ovocytes). Les réponses obtenues nous permettront de progresser dans la compréhension du rôle des gènes que nous avons modifiés dans nos lignées de lapins.

Le protocole expérimental comporte pour chaque animal une opération chirurgicale (ovariectomie), des injections d'hormones ou d'analogues /inhibiteurs d'hormone, trois prises de sang au maximum. Les animaux seront euthanasiés à la fin de l'expérimentation.

L'ovariectomie ne provoque pas d'effet délétère.

L'anesthésie de l'animal et l'acte chirurgical peuvent avoir des effets délétères.

Certains traitements hormonaux seront identiques à ceux administrés lors des traitements de super ovulation. Aucun effet délétère ne leur a jamais été attribué à ce jour.

D'autres traitements consisteront à utiliser des inhibiteurs ou des analogues d'hormones et de vitamines. Les effets délétères de ces composés sont parfois connus. Si les animaux présentent des signes de souffrance manifestement dus au traitement par ces substances, le traitement sera arrêté. Dans tous les cas, si des effets délétères sont constatés et ne cessent pas, les animaux seront euthanasiés.

Ce protocole nécessite le recours aux animaux car aucun modèle in vitro ne permet de rendre compte de la complexité de l'organisation d'un ovaire.

Des lots d'animaux GM (6) et non GM (6) seront constitués pour chaque étude. Le nombre d'animaux par lot est établi pour tenir compte des éventuelles variations individuelles et permettre une analyse statistique des résultats.

Une durée de 5 ans est demandée pour le projet. Dix lots (pour un total de 120 lapins) pourront ainsi être analysés au cours des 5 ans à venir.

Toutes les précautions seront prises pour gérer de façon optimale les douleurs éventuellement engendrées :

- Les procédures opératoires seront raffinées autant que possible : utilisation d'un protocole expérimental qui limite l'amplitude de l'ouverture cutanée, qui est rapide, le moins invasif possible ; utilisation de matériel chirurgical adapté, intervention de personnel formé à la chirurgie ; utilisation de méthodes d'anesthésie et d'analgésie pour réduire la douleur pendant et après l'opération.

- surveillance des animaux dans l'élevage pour détecter les signes de douleur et d'altération de la santé. Demande d'intervention auprès des vétérinaires présents sur le centre (dans l'unité, au sein de l'unité élevage du centre) ou le vétérinaire sanitaire responsable du bâtiment. Les recommandations du vétérinaire seront alors suivies pour soigner l'animal et supprimer la douleur. Si les soins ou l'arrêt de l'expérimentation n'apportent aucun résultat positif, l'animal sera euthanasié.

L'élevage sera fait en prenant des précautions visant à réduire toute altération du comportement. L'expérimentation nécessite une gestion individuelle des animaux. Ainsi, chaque animal sera seul dans une cage, plusieurs cages étant groupées dans le même local. Pour que cet isolement par cage ne perturbe pas les animaux, les cages seront grillagées ce qui permettra aux animaux d'avoir des contacts visuels. Chaque cage sera agrémentée d'une mezzanine pour permettre à l'animal de se déplacer dans un plus grand espace. Des enrichissements seront proposés aux animaux (balles type

ping-pong). L'environnement (bruit, odeurs, lumière, température, hygrométrie) sera contrôlé et maintenu stable au cours du temps.

8350 La tuberculose constitue un important problème de santé publique. Cette maladie infectieuse est causée par la bactérie pathogène *Mycobacterium tuberculosis*. A l'heure actuelle le BCG (Bacille de Calmette et Guérin) constitue le seul vaccin disponible pour lutter contre la tuberculose. Ce vaccin permet de prévenir les formes mortelles de la maladie rencontrées chez l'enfant. En revanche il s'avère peu efficace pour lutter contre la forme pulmonaire rencontrée chez l'adulte. La recherche de nouveaux vaccins plus efficaces est donc devenue une priorité dans la lutte anti-tuberculose.

Dans un modèle murin, il a été précédemment démontré que l'antigène HBHA (Heparin Binding Heemagglutinin) est capable, lorsqu'il est administré seul, d'induire une protection similaire à celle offerte par le BCG contre une infection par *Mycobacterium tuberculosis*.

Parallèlement, l'administration du BCG étant largement répandue de par le monde, nous avons choisi de développer une stratégie vaccinale prenant en compte cette vaccination préalable. Il s'agit d'essayer d'accroître l'immunité protectrice induite par le BCG en réalisant des rappels vaccinaux à l'aide de l'antigène HBHA. La preuve de concept a déjà été apportée lors d'une étude précédente. En effet, il a été démontré que, chez la souris, deux injections de HBHA en présence d'un adjuvant expérimental sont capables de diminuer fortement la quantité de bactéries présentes dans les poumons et dans la rate. Afin d'envisager un passage en phases d'essais cliniques, les objectifs de ce projet seront triples. Il s'agira d'une part d'identifier un adjuvant utilisable chez l'humain et capable d'éliciter l'immunogénicité de la HBHA. Par ailleurs, la HBHA est purifiée à l'heure actuelle à partir de BCG à l'échelle du laboratoire. Au cours de ce projet, il s'agira donc également de mettre au point un processus de purification adapté à l'échelle industrielle et de tester l'immunogénicité et l'effet protecteur de l'antigène HBHA produit en conditions GMP (Good Manufacturing Practices). Enfin, les études précédentes ayant montré une forte influence du délai entre l'administration de BCG et celle de HBHA sur la protection finale, nous nous efforcerons donc également d'optimiser le calendrier vaccinal. Ce travail sera complété par des études de doses réponse afin d'identifier la quantité optimale de HBHA par injection ainsi que le nombre d'injections nécessaires. L'ensemble de ce projet sera réalisé dans le modèle murin. En effet, aucun marqueur de protection n'ayant été identifié pour le moment chez l'homme, il est donc impossible de substituer le modèle animal par un modèle *in vitro* pour mesurer l'efficacité d'un vaccin anti-tuberculose. Nos études répondront à la règle des 3R : Réduire, Remplacer, Raffiner. Toutes les approches permettant une analyse multiparamétrique seront mises en œuvre pour obtenir le maximum de données exploitables par expérience, afin de limiter le nombre de souris utilisées.

L'immunogénicité des différents lots de HBHA produits devra être testée avant d'utiliser ces lots dans des expériences de protection contre *M. tuberculosis*, coûteuses en animaux, en temps et en argent. Ces expériences de contrôle qualité nécessitent d'immuniser des souris avec différentes souches mycobactériennes et de récupérer ensuite les cellules spléniques afin de les stimuler *in vitro* par l'antigène HBHA et ainsi mesurer la réponse immunitaire induite. Avec un nombre restreint de souris (16 par manipulation) il est possible de récupérer suffisamment de cellules pour tester une quinzaine de lots de HBHA différents. Nous prévoyons une expérience tous les 2 mois soit 480 souris au total sur 5 ans.

Les expériences de protection seront composées de 5 groupes de souris vaccinées. 14 animaux par groupe seront nécessaires afin de pouvoir obtenir des résultats statistiquement significatifs. La moitié des animaux seront utilisés pour l'analyse de la réponse immunitaire induite par la vaccination, l'autre permettra d'évaluer l'efficacité de la vaccination face à une infection par *M. tuberculosis*. Chaque année nous envisageons de réaliser 5 expériences de vaccination, ce qui signifie que 350 animaux/an seront nécessaires, soit 1750 souris pour 5 ans.

Le projet au complet nécessitera $480 + 1750 = 2230$ souris.

L'ensemble de ces expériences n'est pas attendu pour générer de douleurs sévères. Néanmoins afin de fixer un point limite, il est décidé que toute perte de poids de plus de 20% par rapport au temps zéro conduira à une euthanasie de l'animal. Il en sera de même si une prostration prolongée ou un mauvais état général venait à être observé.

8351 Jusqu'aux épidémies récentes liées au virus Zika, d'abord en Polynésie Française en 2013-2014, dans la région Pacifique et enfin au Brésil depuis 2015, ce virus n'était pas connu pour causer de symptômes sévères. Cependant, l'épidémie en Polynésie Française a été associée avec une augmentation du nombre de cas de syndrome de Guillain-Barré suite à l'infection, tandis que l'épidémie au Brésil a été corrélée avec une augmentation sévère de cas de malformations fœtales gravissimes (ex. microcéphalies) suite à l'infection de femmes enceintes.

Le virus Zika est un virus transmis par le moustique, comme les virus de la dengue, West Nile ou de la fièvre jaune. Cependant, des cas de transmission interhumaine par voie sexuelle ou périnatale ont aussi été décrits. La présence d'une charge virale importante dans le lait maternel après infection de la mère a également été rapportée, et il a été montré in vitro que le virus contenu dans ce lait était bien infectieux. D'autres études ont également sérieusement suggéré la possibilité de transmission d'autres virus de la même famille (Flaviviridae), comme les virus de la dengue, West Nile ou de la fièvre jaune, lors de l'allaitement maternel. Il est donc important de tester la possibilité de la transmission du Virus Zika de la mère à l'enfant lors de l'allaitement maternel ainsi que la pathogénicité associée pour le nourrisson.

Pour commencer à répondre à ces questions, ce projet vise donc en premier lieu (240 souris) à tester la transmissibilité du virus Zika par voie orale à un modèle souris/souriceau (lignée IFNAR-/-), dont il a déjà été démontré qu'il est susceptible à l'infection par d'autres voies. Nous comparerons, l'efficacité d'infection obtenue par voie orale comparée à ces autres voies (intrapéritonéale ou sous-cutanée).

Dans un deuxième temps, si les premiers résultats sont positifs, nous testerons si la barrière digestive peut constituer une porte d'entrée du virus dans l'organisme, au cours de l'allaitement (72 souris). Enfin, nous mesurerons l'influence d'un type cellulaire au niveau intestinal sur l'efficacité d'infection (216 souris) : les cellules M (ou Microfold) sont en effet des cellules de la barrière intestinale impliquées dans la mise en place de la réponse/tolérance immunitaire, mais elles ont aussi été impliquées dans l'entrée de nombreux pathogènes à ce niveau, y compris des virus (poliovirus, VIH.).

Ce projet comprend 3 procédures au cours desquelles un maximum de 528 souris seront utilisées (souriceaux ou jeunes souris). Les procédures 1 et 3 seront de classe sévère (étude de pathogénicité/morbidité), tandis que la procédure 2 sera de classe modérée (animaux euthanasiés de manière précoce après infection).

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

L'infection par le virus Zika de ce modèle d'étude conduit, lorsque la dose infectieuse est suffisante, à la mort de l'animal. Des points limites adaptés seront utilisés pour pouvoir mesurer la pathogénicité liée à l'infection tout en limitant au maximum la souffrance des animaux.

Ce projet fait suite à une étude in vitro actuellement réalisée dans notre laboratoire visant à mesurer l'infection et le franchissement d'un modèle de barrière intestinale par le virus Zika. Cependant, ce modèle in vitro ne permet pas de déterminer si ce passage conduit à l'infection de l'organisme entier ni l'efficacité d'infection et la pathogénicité engendrées.

Les résultats obtenus dans la procédure 1 seront analysés, et une étude statistique sera effectuée, afin de réduire le nombre de groupes expérimentaux nécessaires (en adaptant leur taille) pour obtenir des résultats statistiquement significatifs pour les autres procédures, notamment la procédure 3.

8352 Il existe à l'heure actuelle 600 millions d'individus obèses de par le monde. En France, 14,5 % de la population adulte est obèse. La progression rapide de ce nombre s'accompagne d'une explosion de la prévalence des pathologies associées telles que le diabète de type 2 et les maladies cardiovasculaires. Il est désormais établi que la résistance à l'action hypoglycémiant de l'insuline est la véritable pierre angulaire des complications induites par l'obésité. Néanmoins, la compréhension des mécanismes qui sous-tendent les liens entre obésité et insulino-résistance reste, à l'heure actuelle, très imparfaite. Cette compréhension demeure cependant essentielle dans le but de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques de prévention des complications métaboliques et cardiovasculaires de l'obésité, en particulier du fait du manque criant de molécules efficaces et du rendement particulièrement faible des stratégies proposées actuellement telles que les régimes spécifiques ou l'exercice physique.

La lipolyse, autrement dit l'étude des acteurs et mécanismes qui conduisent à la libération des acides gras stockés dans les tissus adipeux et le muscle squelettique lors de situations de besoins énergétiques (jeûne, exercice physique.), est une des nombreuses pistes d'investigation dans le domaine de l'obésité et des maladies métaboliques. En effet, il a été récemment démontré qu'en réduisant cette libération, un moindre stockage nocif d'espèces lipidiques dans les tissus périphériques, tel le muscle, était observé, ceci sans favoriser un stockage supplémentaire dans les tissus adipeux. Par ailleurs et de façon importante, un lien causal entre dysfonction de la lipolyse et l'insulino-résistance a été mis en évidence.

L'objectif de ce projet est donc double :

- fondamental en étudiant la contribution précise des acteurs de la lipolyse sur le contrôle de l'insulino-sensibilité.
- thérapeutique (préclinique) en évaluant l'efficacité d'une diminution chronique de la lipolyse en tant que nouvelle stratégie permettant de combattre l'insulino-résistance des personnes obèses.

Pour mener à bien ce vaste projet, nous utiliserons le modèle souris en conformité avec la règle des 3R. La nécessité d'étudier le lien causal entre déficit de lipolyse et insulino-résistance in vivo et la validité préclinique de cette stratégie thérapeutique justifie l'impossibilité de remplacer le modèle murin par des modèles cellulaires. Le nombre total estimé de souris que nous expérimenterons sera de 1410, répartis en 133 lots expérimentaux de 10 souris mâles, ainsi que 80 souris femelles, reflétant les nombreux acteurs et stratégies thérapeutiques que nous étudierons au niveau de 2 tissus (tissu adipeux et muscle) et du corps entier. Tous ces lots sont sains et ne développent pas spontanément de pathologies handicapantes et douloureuses. Une réduction optimale du nombre d'animaux par lots expérimentaux (10) a été prise en compte dans notre évaluation, en dessous duquel nous ne pouvons-nous affranchir de la forte hétérogénéité interindividuelle existant au niveau métabolique chez les souris de laboratoire (malgré l'utilisation de tests statistiques appropriés). Enfin, toutes les procédures expérimentales seront menées grâce à l'intervention et au suivi quotidien de personnel formé et compétent au travail avec l'animal.

8353 De nombreuses disciplines de la recherche biomédicale ont recours à l'utilisation de rats portant une ou plusieurs modifications génétiques. Certaines lignées portent un caractère supplémentaire par addition d'un gène (lignées transgéniques) alors que d'autres sont déficientes pour un gène qui a été rendu inactif soit en permanence, soit sous l'effet d'un traitement chimique, soit sous l'effet d'un autre gène. Il existe actuellement plusieurs centaines de ces lignées de rats.

L'élevage des lignées doit être pris en charge par du personnel compétent, selon des règles strictes afin d'assurer le bien-être des animaux et d'ajuster le nombre d'animaux produits aux besoins des projets de recherche qui y ont recours. Pour garantir la bonne santé des animaux et la qualité des résultats expérimentaux, les animaux doivent être élevés et maintenus dans de bonnes conditions sanitaires (élevage sous barrière, aux statuts exempts d'organismes pathogènes et d'opportunistes spécifiques : EOPS et EOOPS)

Ce projet concerne la décontamination pour introduction et élevage en zone protégée d'environ 25 lignées génétiquement modifiées de rats pour répondre à la demande d'une dizaine de chercheurs.

La décontamination des lignées est réalisée par obtention d'embryons qui sont transférés stérilement par voie chirurgicale dans une femelle receveuse pseudo-gestante de statut EOOPS. Les bébés issus de la décontamination sont ensuite accouplés pour établir une nouvelle colonie. Les lignées décontaminées en vue d'être élevées sous barrière ne présentent pas de phénotype dommageable pour l'animal.

La nécessité de recourir à ces modèles animaux est justifiée dans chacun des projets qui les utilisent. Le nombre de lignées en élevage et le niveau de production de chacune sont révisés périodiquement avec les chercheurs en fonction de leurs projets, afin d'ajuster au mieux aux besoins réels et d'éviter de produire des animaux inutilement.

Les dommages infligés aux animaux dans le cadre de ce projet sont limités à la super-ovulation des femelles donneuses d'embryons, et à la réimplantation par chirurgie de ces embryons, après nettoyage par rinçages successifs, dans des femelles pseudo-gestantes de statut sanitaire EOOPS.

Les femelles opérées reçoivent des antalgiques en pré- et en post-opératoire pour éviter toute douleur ou inconfort, et sont surveillées régulièrement tout au long de leur gestation jusqu'à leur mise-bas.

Le niveau de sévérité est léger pour la super-ovulation des femelles donneuses et modéré pour la réimplantation chirurgicale d'embryons dans des femelles pseudo-gestantes.

Cette activité conduira, en 5 ans, à l'utilisation de 450 animaux pour la décontamination d'environ 25 lignées de rats qui seront ensuite élevées pour être utilisées dans plusieurs projets autorisés.

8354 Dans certaines affections la perte osseuse est excessivement importante et ne peut cicatriser spontanément à cause de l'éloignement des berges du défaut osseux.

Ces pertes de tissu osseux nécessitent une substitution pour conserver l'intégrité et assurer les fonctionnalités mécaniques et biologiques du squelette. Le comblement et la régénération des pertes osseuses est un défi majeur dans la chirurgie orthopédique, maxillo-faciale, du rachis ou en traumatologie. Actuellement, il existe un éventail très varié de greffes osseuses d'origine biologique ou de substituts osseux synthétiques (Biomatériaux). Afin que ces matériaux soient utilisés chez l'homme, ils doivent passer par une série de tests in vivo afin d'être validés et autorisés.

Selon la définition décrite dans la bibliographie, et dans le but de reproduire une perte osseuse qui ne peut cicatriser spontanément « défaut de taille critique ». La brebis, le chien et les lapins sont les espèces les plus utilisées comme modèles in vivo. Ces défauts peuvent être situés en zone diaphysaire (défauts segmentaires) soumis à d'importantes sollicitations mécaniques et donc nécessitent une stabilisation chirurgicale par ostéosynthèse, ou en zone métaphyso-épiphysaire (défauts cylindriques) sans ostéosynthèse associée.

L'utilisation de défaut de taille critique fait partie de la démarche habituelle d'évaluation des substituts osseux. Aussi, les protocoles de recherche faisant appel à ce type de modèles sont fréquemment mis œuvre.

Le projet concerne des protocoles répétitifs mis en œuvre plusieurs fois par an, comportant à chaque fois un témoin positif/matériau de référence et/ou autogreffe (témoin positif) et le matériau à évaluer, qu'il s'agisse d'un biomatériau seul ou de composites (biomatériaux combinés avec des cellules associés ou non à des molécules actives) issus de l'ingénierie tissulaire osseuse.

Le nombre total des brebis prévus dans ce projet sur 5 ans sont 90 brebis. Le nombre d'animaux est ici une moyenne estimée sur la base des études réalisées régulièrement depuis des années et qui font partie des prestations couramment offertes.

Ce projet sera réalisé dans le respect de la règle des 3R :

Remplacement : Biomatériau testé préalablement in vitro, animaux utilisés lors des phases nécessitant des essais in vivo à visée fonctionnelle.

Réduction : utilisation de tests statistiques non paramétriques.

Raffinement : gestion de la douleur per et postopératoire, définition des points-limites.

8355 L'objectif de ce projet est de préparer, pour la communauté scientifique française et européenne, des modèles pathologiques chez le rat ou la souris. Le principe général est l'induction d'une affection chez le rongeur par le biais d'une intervention chirurgicale. Ce projet inclut les modèles du diabète, de l'insuffisance hépatique, arthrose, vagotomie et modèle d'infarctus du myocarde. Ce projet est l'étape de création du modèle, les animaux sont expédiés chez le demandeur, celui-ci dispose d'un projet pour son étude.

Ces modèles sont ensuite utilisés en France et en Europe, dans les domaines de la recherche fondamentale et des études précliniques afin de contribuer au développement de médicaments.

Les études précliniques et fondamentales sur rongeurs opérés permettent d'étudier les réactions de l'organisme et les différentes réactions immunitaires après administration des produits à tester, donc les traitements associés ne peuvent pas être étudiés in vitro. Ces interactions ne sont pas des phénomènes isolés et par conséquent ne peuvent pas être étudiées in vitro sur un seul type de cellule.

Les animaux utilisés sont hébergés dans un environnement adapté à l'espèce, au nombre et à l'âge ou au poids. Ils évoluent dans un milieu enrichi et des points limites sont appliqués.

Ce projet comporte 5 procédures correspondant chacune à un type de modèle pathologique induit : induction du diabète, modèle d'insuffisance hépatique, l'arthrose, vagotomie et modèle d'infarctus du myocarde.

Les chirurgies sont réalisées selon des procédures standardisées et adaptées aux spécificités de souche, sexe, âge et poids. Le bâtiment de chirurgie est dédié à cette activité et les chirurgiens sont qualifiés.

Le bien-être animal est une priorité : l'injection d'un analgésique en péri-opératoire est réalisée pour contrôler la douleur. Toutes les interventions chirurgicales sont réalisées sur animaux anesthésiés, qui sont préalablement préparés de manière aseptique pour l'intervention. Les soins post-opératoires sont réalisés sur les animaux avec un suivi clinique et l'administration d'antidouleur. Les points limites sont définis en fonction des spécificités du modèle. Les animaux sont observés quotidiennement.

Basé sur des données précédentes, le nombre d'animaux destiné à des chirurgies de ce type d'intervention est de 520 animaux par an (soit 420 rats et 100 souris). Le projet étant prévu pour 5 ans, il est estimé à 2600 animaux (soit 2100 rats et 500 souris).

8356 En dépit des avancées considérables du traitement des maladies cardiovasculaires au niveau pharmacologique et chirurgical, l'insuffisance cardiaque demeure un important problème de santé publique. L'ischémie cardiaque, qui se développe fréquemment chez les patients ayant survécu à l'infarctus du myocarde, est considérée comme la cardiomyopathie la plus courante. Quant à l'ischémie du membre inférieur, cette pathologie est une conséquence aggravée de l'athérosclérose qui conduit à l'obstruction des artères au niveau des orteils, puis de la jambe et donc à une perte de la circulation sanguine dans le membre. Cette maladie incurable qui touche en particulier les diabétiques se soigne essentiellement par amputation avec un taux de survie très faible. Pour ces deux pathologies, des thérapies géniques et cellulaires pro-angiogénique visant la revascularisation du muscle ischémique représentent de potentiels traitements d'avenir. Le présent projet a pour objectif de tester si l'administration, de vecteurs lentiviraux ou de cellules souches mésenchymateuses génétiquement modifiées sur-exprimant un cocktail de facteurs angiogéniques, permettrait de favoriser la revascularisation du muscle ischémique dans des modèles animaux d'ischémie du membre inférieur ou d'ischémie cardiaque. Ce projet prévoit l'utilisation de 240 rats et 300 souris. Ces chiffres correspondent au minimum d'animaux que nous puissions utiliser afin d'avoir des résultats statistiques. Nous travaillons dans le respect des 3R "Remplacer, Réduire, Raffiner". Nous remplaçons dès que possible l'expérimentation animale par des tests en culture de cellule, nous réduisons le nombre d'animaux utilisés au minimum nécessaire pour avoir un test statistique permettant de tirer une conclusion, nous raffinons les conditions de vie de l'animal en limitant le nombre d'animaux par cage, et en adaptant ce nombre selon leur comportement. Les animaux sont examinés cliniquement bi quotidiennement ou plus fréquemment en fonction de leur état. Les changes des cages sont effectués une fois par semaine ou plus si besoin afin d'avoir une litière propre, et qu'il y ait suffisamment d'eau à boire et d'aliments. Pour éviter la douleur nous utilisons des anesthésiques et des antalgiques dès que c'est nécessaire.

8357 La maladie de Parkinson est la seconde maladie neurodégénérative la plus fréquente, après la maladie d'Alzheimer. Elle touche environ 150000 personnes en France avec environ 14000 nouveaux cas par an. La prévalence de la maladie augmentant avec l'âge, cette maladie dramatique pose des problèmes considérables en terme de santé publique en raison de l'augmentation de l'espérance de vie. Cette pathologie est caractérisée par des symptômes moteurs tels qu'une difficulté à effectuer des mouvements, ou des tremblements pouvant s'associer à des symptômes cognitifs moins connus. Malheureusement, à ce jour les traitements existants permettent uniquement la prise en charge d'une partie des symptômes mais n'empêchent pas la pathologie de continuer à se développer.

La maladie de Parkinson est caractérisée par une importante perte de neurones spécialisés sécrétant la dopamine ainsi que par la présence dans tout le cerveau d'amas anormaux de protéines appelés " corps de Lewy ", dont l' α -synucléine est le composant majoritaire. Ces agrégats qui se forment dans le cerveau ont été mis en relation avec la mort des neurones à dopamine. Malheureusement, l'état

actuel de la recherche ne permet pas de comprendre pourquoi et comment ces amas se forment. La difficulté de répondre à ces questions vient notamment du fait que l'on ne connaît pas les mécanismes d'internalisation par les cellules neuronales des α -synucléines. La compréhension de ce mécanisme est au cœur de ce projet et permettra nous l'espérons d'identifier des cibles thérapeutiques.

Afin de diminuer au maximum le nombre d'animaux utilisés, cette étude sera réalisée sur 4 primates d'espèce *Macaca fascicularis*, cela représente 1 animal par condition avec les contrôles appropriés. Ces animaux sont couramment utilisés dans les études qui visent à caractériser les mécanismes de dégénérescence en cours dans la maladie de Parkinson. En effet, il existe une forte homologie entre les structures cérébrales des macaques et de l'homme. D'autre part, la réalisation de micro-injections intracérébrales est une technique invasive non applicable chez l'homme. Afin de réduire la douleur, la souffrance et l'anxiété infligées aux animaux, la chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale, avec une prémédication. Les animaux seront sous surveillance continue de l'expérimentateur qui vérifiera une reprise d'un comportement cohérent au réveil de l'anesthésie. Les animaux sont observés et scorés par le personnel compétant quotidiennement, sur des critères comme, la posture de l'animal, son activité, son interaction, sa nutrition, etc. Les animaux seront hébergés ensemble, dans une structure spécialement agréée pour l'hébergement et l'utilisation des primates en recherche, disposant d'équipements et de protocoles adaptés au raffinement du milieu pour cette espèce (nourriture variée, "jouet", fond sonore, etc.).

8358 L'élément zinc (Zn) est à la fois un élément essentiel pour le métabolisme et un métal polluant pour l'environnement. Chez le poulet, une réduction du niveau d'apport en zinc peut conduire à une subcarence qui se manifeste par des dysfonctionnements, comme des retards de croissance ou des déficiences des fonctions immunitaires, pouvant mettre à mal le bien-être des animaux. La disponibilité du zinc alimentaire est très variable en fonction des sources de zinc utilisées. L'objectif de l'étude est de mieux comprendre le lien entre propriétés physicochimiques des sources de zinc et réponse biologique de l'animal.

Un maximum de 142 poulets sera réparti en cage individuelle en vue de collecte de fientes.

- remplacement : l'utilisation digestive et métabolique de zinc fait intervenir un ensemble de mécanismes complexes. La construction d'un modèle *in silico* ou *in vitro* pour prédire ces phénomènes n'est pas possible à cause du manque de données. Compte tenu de l'objectif du projet, le modèle animal ne peut être substitué par un modèle d'étude *in vitro* ou *in silico*.

- réduction : le nombre d'animaux a été réduit à son minimum en tenant compte 1. De la distribution et l'homogénéité des poids des animaux attendues au moment de la procédure expérimentale et 2. De la puissance permettant de montrer une différence significative entre traitements et pertinente d'un point de vue biologique sur le critère de teneur en zinc du tibia.

- raffinement : pour limiter au maximum l'anxiété et la souffrance des animaux, plusieurs mesures seront mises en place. Les poussins seront hébergés au sol en groupe pendant 1 semaine à une densité inférieure au maximum autorisé. Un minimum de 4 poussins par groupe est nécessaire pour créer des interactions sociales entre les poussins et respecter la taille moyenne d'une couvée. La durée de la procédure expérimentale sera limitée à 2 semaines. Des enrichissements appropriés du milieu de vie (au sol et en cage individuelle) seront mis en place. Les animaux seront visités au moins une fois par jour.

8359 L'une des premières prises de conscience des effets majeurs de la pollution atmosphérique sur la santé a eu lieu lors d'un épisode survenu à Londres pendant l'hiver 1952 : durant 4 jours, un épais brouillard s'est abattu sur la ville, et 4000 décès supplémentaires (par rapport à la même période les années précédentes) ont été enregistrés, plus de la moitié étant pour causes respiratoires. L'Organisation Mondiale de la Santé a depuis estimé que, pour la seule année 2012, 3,7 millions de morts survenaient prématurément du fait de la pollution atmosphérique, et a déclaré, en 2014, la pollution atmosphérique comme représentant le plus large risque environnemental pour la santé.

L'un des principaux challenges dans le contexte de l'étude des effets sur la santé de la pollution atmosphérique résulte en effet de l'extrême complexité du mélange atmosphérique : à n'importe quel point de l'espace, des milliers d'espèces de polluants ayant une diversité chimique énorme coexistent,

produisant ainsi une réactivité chimique instantanée qu'il est impossible d'estimer avec les méthodes classiques de la chimie organique. De plus, cette réactivité est hautement modulée avec le temps du fait de la transformation rapide de nombreuses espèces sur des échelles de temps allant de la seconde à la minute. La pollution atmosphérique est ainsi constituée d'un mélange complexe de plusieurs milliers de composants qui évoluent dans le temps. Du point de vue de la santé, les constituants de la pollution atmosphérique le plus souvent associés à des effets délétères sont les polluants gazeux (comme l'ozone, le monoxyde de carbone, les oxydes d'azote, ...) et les particules. Cependant, et comme évoqué plus haut, la pertinence d'une telle approche basée sur l'étude des composants isolés de la pollution est entamée du fait de l'absence de considération de la synergie suspectée entre les différents constituants de la pollution atmosphérique. Nous disposons d'un système unique permettant la génération d'atmosphères polluées complexes, en association avec l'exposition d'animaux, ce qui nous permettra d'aborder la problématique des effets sur la santé d'expositions à la pollution atmosphérique avec un degré de complexité plus pertinent.

Nous nous proposons de répondre à plusieurs questions portant sur les conséquences d'expositions à des atmosphères complexes réalistes : 1/ une exposition pendant la gestation a-t-elle des conséquences sur la descendance (première et deuxième générations) ? ; 2/ des petits nés de mères exposées pendant la gestation sont-ils plus susceptibles de développer une pathologie respiratoire de type bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou cardiaque (cardiomyopathie) à l'âge adulte ? ; et 3/ quelles sont les conséquences respiratoires et cardiaques d'expositions répétées à de telles atmosphères à l'âge adulte ? Afin de mimer au mieux les conditions environnementales auxquelles sont exposées les populations actuellement, nous reproduirons ces mêmes expérimentations dans des modèles de souris rendues obèses après un régime enrichi en graisses. Nous travaillerons ainsi sur 3 atmosphères modèle, représentatives de la pollution atmosphérique présente dans une zone urbaine européenne moyennement polluée (Paris), une zone urbaine très polluée (Pékin) et une zone urbaine européenne du futur (Méditerranée).

Les souris seront exposées aux différentes atmosphères (10 jours continus pendant la gestation ou 1 semaine par mois à l'âge adulte) grâce au couplage de la chambre de simulation atmosphérique avec une armoire de stabulation permettant l'hébergement des souris dans leur cage ventilée, sans modification de leur environnement proche. Une partie de l'armoire a été isolée de façon à y faire entrer de l'air non pollué (filtré à l'entrée). Pour l'exposition à la fumée de cigarettes, nous disposons d'une machine permettant là encore d'exposer les animaux sans les déplacer de leur cage.

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

Le projet prévoit le recours à un nombre d'animaux aussi limité que possible : 5826 souris au total (dont 2412 souriceaux à générer). Un suivi clinique des animaux sera réalisé tout au long des expériences, ainsi les animaux présentant un ou plusieurs signes de souffrance (perte d'activité, difficultés locomotrices, difficultés à respirer) seront euthanasiés après anesthésie à l'isoflurane. Afin d'enrichir le milieu, les cages auront de la sciure de bois, du coton, et des bouts de bois. Le modèle animal ne peut pas être actuellement remplacé par des tests alternatifs pour l'étude des effets explorés.

8360 En cancérologie, certains traitements visent les vaisseaux sanguins nouvellement formés dans la tumeur. L'échographie de contraste est une modalité d'imagerie qui permet de voir très précocement la réponse au traitement, sans irradier le patient. La question posée par le projet est la faisabilité de l'imagerie en 4D (3D temps réel) et le bénéfice apporté par rapport aux examens 2D actuellement pratiqués en routine clinique. L'imagerie échographique 4D s'affranchit de la dépendance à l'opérateur en permettant d'acquérir une image volumique et non plus un unique plan de coupe comme en échographie traditionnelle.

Après un grand nombre d'expérimentations sur des objets in vitro, ce projet a pour but de valider la méthodologie 4D sur des souris avant de proposer ce type d'examen aux patients. Le bénéfice attendu est de pouvoir voir précocement la réponse au traitement anti-tumoral avec une imagerie 4D et permettant de rendre compte des modifications sur le volume tumoral global.

En imagerie, un maximum de réglages est optimisé sur des fantômes mimant un milieu biologique. Néanmoins des études précliniques sur animaux vivants sont indispensables afin de valider les mises aux points précédemment faites (exemple : la respiration peut perturber la qualité des enregistrements lors de certaines sessions d'imagerie).

De plus, le recours aux animaux est indispensable pour reproduire un modèle oncologique réaliste proche de l'homme et de retrouver tout le microenvironnement tumoral (stroma) et vasculaire permettant le développement des tumeurs. Une validation sur animal vivant est donc indispensable afin de se rapprocher au plus près des résultats qui pourront être observés par la suite en recherche clinique.

Cette étude sera menée sur 240 souris sur une durée de 5 ans, permettant de rendre compte de la très grande hétérogénéité du phénomène observé, les sous-groupes analysés devant être suffisamment homogènes pour être exploités.

Mise en œuvre de la règle des 3R :

- Remplacement : un maximum de réglages d'imagerie est déjà optimisé sur des objets mimant le milieu biologique, cependant les études précliniques sont indispensables pour valider les mises au point, en tenant compte, par exemple, de la respiration qui peut perturber l'image. Par ailleurs, le recours aux animaux permet de reproduire un modèle de cancer qui est indispensable pour se rapprocher au plus près des résultats qui pourront être observés par la suite en recherche clinique.

- Réduction : le nombre d'animaux a été réduit au minimum compte tenu du type de test statistique et de la variabilité du phénomène observé (grande hétérogénéité vasculaire). Ce nombre est cependant nécessaire pour pouvoir s'assurer de la pertinence des résultats, et ainsi d'évaluer les performances des méthodologies développées et le bénéfice apporté pour des examens cliniques. L'imagerie ultrasonore est une méthode d'imagerie non-invasive qui permet de faire un suivi longitudinal de la croissance tumorale et de l'évaluation des traitements, les souris étant leur propre témoin. Le bénéfice apporté par l'imagerie 4D sera évalué par différentes méthodes de quantification. Il est important de noter que les images 4D sont acquises avec des appareils dédiés et sont exploitées de manière très différente des images 2D, ce qui explique la complexité de la procédure.

- Raffinement : toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie, et les animaux bénéficieront d'un enrichissement permanent. Par ailleurs, le développement de l'imagerie in vivo est une technique qui permet d'optimiser et donc de raffiner les procédures utilisant des animaux (suivis non invasifs longitudinaux).

Tout sera mis en œuvre pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse des animaux utilisés. Les animaux seront anesthésiés pendant toutes les expérimentations, qui sont principalement des procédures d'imagerie non-invasive, de contrainte mineure.

8361 Contexte : Le sepsis est défini comme une infection de l'organisme par un agent pathogène, qui conduit à une dysfonction d'organe menaçant le pronostic vital. En s'aggravant, le sepsis peut conduire au choc septique, stade le plus grave de l'infection, qui est responsable chaque année de nombreux décès (30 à 45%) malgré une prise en charge optimale. Les raisons pour lesquelles une bactérie peut être responsable d'une infection contrôlée ou d'un choc septique fatal ne sont pas encore complètement comprises. Une recherche scientifique est donc nécessaire pour mieux comprendre les mécanismes du sepsis et du choc septique, afin de trouver de nouveaux traitements.

Une des principales caractéristiques du sepsis est le développement d'une inflammation excessive et non contrôlée, qui a des conséquences délétères sur l'organisme pouvant conduire au décès. On sait par exemple que les globules blancs, en particulier les polynucléaires neutrophiles, jouent un rôle central dans la réaction inflammatoire. Par contre, on connaît beaucoup moins bien le rôle joué par les plaquettes sanguines. Celles-ci sont bien connues pour leur rôle clé dans l'arrêt du saignement, en s'accumulant au site de lésion vasculaire pour former un agrégat qui arrête les saignements. Dans le sepsis et le choc septique, des résultats récents indiquent que les plaquettes pourraient avoir des

effets délétères par l'exacerbation de l'inflammation mais aussi des effets bénéfiques par leurs propriétés anti-infectieuses. La glycoprotéine VI (GPVI), présente à la surface des plaquettes, constitue le récepteur du collagène de la paroi vasculaire et joue un rôle central dans l'activation des plaquettes. Des travaux très récents indiquent que la GPVI possède des ligands autres que le collagène et que ces ligands diffèrent selon l'espèce humaine ou de souris. C'est pourquoi, nous souhaitons comparer le rôle de la GPVI d'origine humaine à celui de la GPVI de souris dans le sepsis et le choc septique. Pour ce faire, nous utiliserons des souris dites humanisées, c'est-à-dire qu'elles expriment la GPVI humaine à la place de la GPVI de souris. Ce travail sera réalisé à l'aide d'un modèle de souris en choc septique, d'origine polymicrobienne, par péritonite.

Réduire : Les nombres d'animaux utilisés lors des expériences seront réduits au minimum nécessaire, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives. Le maximum de tissus sera prélevé sur un même animal.

Raffiner : Afin de limiter l'angoisse, l'inconfort, le stress et la douleur associés, les expériences sont raffinées :

- le maximum d'expériences sera réalisé sur des animaux anesthésiés;
- des traitements antalgiques seront administrés ;
- les conditions d'hébergement des animaux seront adaptées à leur état ;
- les expériences sur animaux vigiles auront une durée limitée dans le temps ;

Remplacer : Dans la mesure du possible, les expériences in vivo sur souris seront remplacées par des études in vitro sur cellules.

L'ensemble de ces expériences nécessitera 92 souris.

8362 Les sérums thérapeutiques tels que les sérums antivenimeux, sont actuellement nécessaires, dans les pays à risque, pour lutter contre les envenimations accidentelles. Des médicaments en immunologie, en oncologie, mais aussi des kits de diagnostics, font appel, pour leur mise au point ou leur production, à des anticorps dirigés contre des protéines variées : extraits de microbes pathogènes, cellules cancéreuses, hormones. Il est possible de produire des anticorps monoclonaux à partir de cultures de cellules. En revanche, la production des anticorps polyclonaux ne peut pas se faire en utilisant des méthodes in vitro et doit faire appel à l'immunisation d'animaux producteurs de sérums. Cela consiste à procéder à l'injection de l'agent contre lequel on souhaite produire des anticorps, à des animaux sains. Selon le pouvoir immunogène de l'agent, on devra ajouter une molécule adjuvante, pour stimuler le recrutement de cellules de l'immunité des animaux. Ceci peut provoquer une irritation passagère, qui est limitée au minimum et contrôlée par le personnel du laboratoire pour éviter un érythème trop important. Suite aux injections, on vérifie que l'animal est bien immunisé, à savoir qu'il présente un taux optimal d'anticorps dans le sérum, et on procède à des prélèvements de sang, qui seront traités pour obtenir des solutions d'anticorps.

Pour ces protocoles, le choix de l'espèce, les immunogènes et les protocoles seront définis de manière à minimiser le nombre d'animaux, d'injections et de prélèvements, tout en permettant l'obtention d'une quantité optimale d'anticorps, couvrant parfois plusieurs années de production (les sérums se conservent très longtemps après congélation). Les méthodes de production sont constamment améliorées afin d'intégrer au mieux le bien-être animal, et d'optimiser la quantité de sérum obtenue avec un minimum d'animaux. Les volumes d'agents injectés, la nature des adjuvants et les volumes de sang prélevés suivent des règles internationales strictes qui garantissent que la souffrance animale soit limitée au minimum.

Notre laboratoire, en tant que prestataire de service pour des unités de recherche, peut être amené à produire du sérum sur plusieurs espèces animales différentes, et plusieurs types d'antigènes différents. Chaque protocole est soumis, individuellement à l'approbation d'une structure interne chargée du bien-être animal, en relation étroite avec un comité d'éthique indépendant. Sur 5 ans il est envisagé d'utiliser au maximum 2000 lapins (20 séries), 100 chiens, 100 porcs, 100 ovins et 100 caprins. Ce nombre est fonction des demandes qui pourraient être formulées à notre laboratoire, mais pourrait être inférieur si ces demandes ne se manifestaient pas.

Pour chaque espèce, un programme d'hébergement, de soin et d'enrichissement du milieu spécifique est mis en place. Ces protocoles étant peu invasifs, les animaux, au sein de chacune des espèces, sont maintenus en groupes sociaux. Les effets des adjuvants sont compensés par des soins locaux, les prélèvements de sang sont limités et compensés par un apport en nourriture enrichie. Avec ces protocoles, il est possible d'utiliser des animaux déjà utilisés dans des projets précédents, ou, si le protocole d'immunisation s'est déroulé sans souffrance particulière, les animaux peuvent être réutilisés, ou placés chez des adoptants.

8363 Les thérapies basées sur des combinaisons d'antirétroviraux sont de précieux outils dans la lutte contre le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH). Cependant, ces traitements ne permettent pas d'éradiquer le virus chez les patients infectés, et restent limités par l'émergence de résistances, la présence d'effets secondaires et leur coût élevé. C'est pourquoi la recherche se tourne actuellement vers le développement de vaccins thérapeutiques qui permettent à l'organisme de contrôler l'infection en éliminant les cellules infectées par le virus.

Pour éliminer les cellules infectées, il est nécessaire d'activer des cellules clés de l'immunité, les cellules dendritiques. Lorsque ces cellules dendritiques rencontrent un antigène/pathogène, elles vont être activées et entraîner la dégradation des cellules infectées.

De nouveaux type de vaccins, les vaccins à ARNm, constituent une piste prometteuse pour le développement de traitement thérapeutique contre le VIH. En effet, ces vaccins ARNm vont activer les cellules dendritiques pour permettre la dégradation des cellules infectées.

Dans ce projet, il a été mis au point une formulation vaccinale permettant le transport aux cellules dendritiques d'ARNm codant une protéine du VIH par des nanoparticules. Ces nanoparticules entrent efficacement dans les cellules dendritiques, et des tests préliminaires réalisés in vitro ont montré leur capacité à activer ces cellules. Nous avons pour but actuellement d'évaluer leurs capacités à induire une réponse immunitaire au niveau d'organisme entier, in vivo. Aucune méthode alternative ne peut donc se substituer à l'utilisation des animaux pour la réalisation de notre projet car il requiert l'analyse de la production des anticorps et l'activation de cellules de dégradation, au niveau sanguin et muqueux. C'est pourquoi le modèle murin, qui est un modèle parfaitement caractérisé est nécessaire.

Le nombre de souris nécessaires a été réduit au minimum sans compromettre l'analyse statistique de nos résultats. Une définition précise des points limites et une surveillance adaptée des animaux par un personnel compétent permet de limiter au maximum toute souffrance animale.

Il est prévu d'utiliser au maximum 415 animaux sur une période de 5 ans.

8364 En cancérologie expérimentale, la mise en œuvre de l'imagerie bi-photonique in vivo (bioluminescence et fluorescence) a considérablement simplifié l'étude de la prolifération/dissémination tumorale dans les modèles de xénogreffes avec des cellules tumorales exprimant un gène rapporteur. L'exploitation de l'imagerie in vivo dans les études de cancérogenèse spontanées reste par contre beaucoup plus complexe lorsque l'objectif vise à détecter des tumeurs à un stade très précoce et dans un territoire anatomique d'exploration difficile tel que l'abdomen. Seule l'imagerie moléculaire est envisageable pour une détection précoce et nécessite la mise en œuvre d'un biomarqueur spécifique du processus tumoral mais utilisable pour une grande variété de tumeurs.

L'objectif de ce projet vise à comparer les performances de l'imagerie moléculaire par les radio-isotopes et l'imagerie tomographique de fluorescence (dirigée contre les intégrines) dans un modèle de cancérogenèse : l'adénocarcinome pancréatique murin.

L'Hypothèse est que l'imagerie fluorescente donnera des résultats comparables aux examens radio-isotopiques. Ainsi, on disposera d'une imagerie fonctionnelle performante et peu contraignante.

Retombées cliniques : Cette étude constitue une preuve de concept. En cas de succès, cela permettra de disposer d'un outil ultrasensible pour la détection tumorale notamment en peropératoire (endoscopique, chirurgicale ou robotique).

Cette étude ne peut pas être remplacée par une méthode alternative puisque son objectif est une imagerie in vivo de la progression tumorale.

Il existe un modèle murin transgénique, récapitulant les différents stades de la progression tumorale pancréatique observée chez l'Homme. La grande reproductibilité du modèle et son utilisation fréquente ont permis d'établir des points limites précoces et prédictifs limitant ainsi au maximum la souffrance animale lors de l'utilisation du modèle. Le nombre d'animaux est réduit (n=16 souris maximum) car les méthodes d'imagerie évaluées ne sont pas invasives et permettent une étude longitudinale des animaux à différents stades d'évolution du cancer.

8365 La démence est caractérisée par une importante réduction des capacités cognitives d'un individu. Bien que de nombreuses molécules soient actuellement en développement, aucune ne permet d'enrayer cette pathologie. Le traitement de référence voit son efficacité diminuer fortement au cours de la progression de la maladie et possède de nombreux effets secondaires chez l'homme notamment sur le transit intestinal.

Nous avons récemment identifié une molécule qui, combinée au produit de référence, était capable de potentialiser l'effet de ce dernier. Ainsi, cette étude répond à deux objectifs complémentaires : une étude comportementale évaluant la réponse pharmacologique de la combinaison complétée par une étude évaluant l'effet des produits sur le transit intestinal.

L'objectif scientifique de ce projet nécessite l'utilisation du modèle de démence pharmacologique chez la souris, particulièrement pertinent pour la caractérisation de la réponse pharmacologique. L'évaluation de la mémoire est impossible par le biais de cultures cellulaires ou de modèles animaux non mammifères. Avec une structuration cérébrale proche de celle de l'homme et un comportement spontanée d'exploration d'éléments nouveaux, la souris est un modèle de choix pour l'étude de ces fonctions cognitives.

Pour ce projet, nous utiliserons au total 168 souris mâles répondants aux deux objectifs complémentaires pour une durée maximale de deux ans. Notre molécule d'intérêt a été développée in vitro. De plus, nous organiserons les injections de façon à économiser des animaux tout en ne provoquant pas d'interférence entre les tâches comportementales et en conservant des nombres suffisants d'individus pour des analyses statistiques pertinentes

Ce projet met en jeu l'administration de substances pharmacologiques, une évaluation de la vitesse du transit intestinal, ainsi qu'une évaluation des fonctions cognitives des souris à l'aide de différents tests comportementaux. Toutes les méthodes possibles seront utilisées pour prendre en compte le bien-être des animaux et leur potentielle souffrance. Une grille d'évaluation des points limites sera utilisée.

Ce projet a pour objectif de révéler que la combinaison de molécules présente une supériorité d'efficacité en comparaison du produit de référence seul. Ainsi, caractériser la réponse pharmacologique de cette combinaison et en évaluer les effets secondaires constitue un élément majeur permettant le développement de combinaisons de médicaments améliorant l'efficacité et la sécurité de certains traitements à visée neurologique et psychiatrique.

8366 L'insuffisance cardiaque se définit par l'incapacité du cœur à assurer un débit sanguin suffisant aux organes, c'est-à-dire une incapacité à perfuser les organes en sang, en oxygène et en éléments nutritifs essentiels à leur fonctionnement. L'insuffisance cardiaque est le stade terminal de toute pathologie cardiaque. On distingue deux types d'insuffisance cardiaque : l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection altérée et l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (IC-FEP).

L'incidence de l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection préservée (IC-FEP) est en continuelle augmentation et représente jusqu'à 50% des insuffisances cardiaques. Mais contrairement à l'insuffisance cardiaque à fraction d'éjection diminuée, le traitement pharmacologique de l'IC-FEP est décevant, entraînant un taux de mortalité élevé.

Des études menées chez le rat ont démontré que la circulation pulmonaire est la première touchée dans les phénomènes primitifs conduisant à l'insuffisance cardiaque. Ainsi, pour ralentir la progression de l'IC-FEP, il a été proposé de protéger les poumons en créant une communication (un shunt) entre l'oreillette gauche et l'oreillette droite du cœur par voie endo-vasculaire chez l'homme.

Cependant, les effets sur la circulation pulmonaire de la communication en comparaison à l'absence de création de communication n'ont pas été décrits ni chez l'homme, ni expérimentalement chez l'animal.

Ainsi, l'objectif de ce projet est de démontrer que la création d'un shunt gauche droit entre les oreillettes cardiaques protège les poumons chez des rats atteints d'IC-FEP.

Pour cela, nous réaliserons une communication entre l'auricule gauche et l'auricule droite par création d'une communication inter-auriculaire chez le rat anesthésié et ventilé. Nous étudierons ensuite les conséquences du shunt gauche droit inter-atrial. Les phénomènes observés apporteront alors des éléments de justification (ou non) de développement des procédures de shunts inter-atriaux chez l'homme en insuffisance cardiaque. Dans ce projet 120 rats seront utilisés, seul un modèle in vivo pouvant répondre à notre problématique. Il n'y a pas de possibilité d'utiliser de modèle in vitro. De plus afin de minimiser le nombre d'animaux, une étude statistique a été réalisée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaires. Des mesures (chirurgie sous anesthésie et analgésie, suivi quotidien, utilisation d'analgésique, enrichissement des cages, etc.) seront prises afin de réduire la contrainte et la douleur et donc d'améliorer le bien-être des animaux avant, pendant et après chaque expérience. Ainsi, les critères de traitement pour soulager l'animal ou les critères d'arrêt définis (points limites) seront appliqués à temps pour éviter toute souffrance inutile.

8367 Ce projet aborde les mécanismes impliqués dans les lésions des vaisseaux au cours de la micro-angiopathie thrombotique. La micro-angiopathie thrombotique, ou MAT, étant une obstruction des petits vaisseaux. Pour la première fois nous étudierons chez la souris les voies de l'autophagie, de l'endothéline et de l'inflammasome dans le développement de ces maladies.

Nous utiliserons différentes lignées de souris génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales au cours de la MAT.

Nous cherchons ainsi à valider in vivo des cibles thérapeutiques préalablement identifiées par des études in vitro.

Nous reproduirons chez la souris deux modèles de MAT mimant deux maladies qu'on retrouve chez l'homme, le syndrome des anti-phospholipides (SAPL) et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT).

En premier lieu, une MAT sera induite chez les souris. Pour le modèle de SAPL, des souris seront injectées avec des anticorps de patients atteints de cette maladie. Pour le modèle de PTT, les souris seront injectées avec des anticorps anti-ADAMTS13. Nous analyserons la fonction rénale en réalisant des prélèvements urinaires. Après 7 ou 10 jours, les souris seront euthanasiées pour prélèvement d'organes afin d'étudier les lésions vasculaires rénales.

Le MAT est une maladie complexe et seule l'expérimentation animale, mimant le plus fidèlement possible le microenvironnement vasculaire, permettra d'étudier les mécanismes impliqués dans les lésions vasculaires rénales au cours de ces maladies.

La souris est un modèle de choix car elle développe des complications vasculaires de MAT proches de celles de l'homme. De plus, nous tirerons parti de la transgénése, c'est-à-dire le fait de pouvoir modifier les gènes des souris, afin d'étudier les cibles identifiées in vitro.

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'anxiété infligée aux animaux, les procédures se dérouleront avec une surveillance journalière et des antalgiques sont prévus en cas de nécessité. Les prélèvements sanguins seront réalisés sous anesthésie générale pour éviter toute souffrance et les souris seront profondément anesthésiées avant l'euthanasie. Enfin, des points-limites ont été établis, entraînant l'euthanasie anticipée de l'animal si nécessaire.

Ce projet s'inscrit sur une durée de 5 ans. Le nombre de souris utilisées sera de 960 maximum. Le nombre d'animaux utilisé est limité à son minimum afin de permettre une analyse statistique scientifiquement pertinente des résultats en prenant en compte la variabilité inter et intra expérience.

A terme, les résultats de ce projet permettront de comprendre plus précisément les mécanismes impliqués dans le développement des lésions micro-vasculaires rénales au cours de la MAT. Ils pourraient permettre le développement de nouveaux médicaments ciblant les voies mises en causes,

permettant ainsi de prévenir ou de freiner le développement des lésions vasculaires au cours de la MAT.

8368 Les maladies psychiatriques et neurologiques sont un enjeu considérable de la santé publique. Nous avons identifié chez les patients des auto-anticorps (AA) dirigés contre le récepteur nicotinique dans leur cerveau. On veut maintenant établir la contribution de ces auto-anticorps à la neuropathologie en utilisant un modèle animal, la souris. 530 souris adultes, mâles, seront utilisées pour infuser ces anticorps humains dans le cerveau de la souris. Il y aura une seule procédure : Pour ceci, les souris seront implantées avec une canule liée à une mini-pompe contenant l'anticorps. Cet acte chirurgical est de sévérité modérée pour l'animal. L'anticorps sera infusé pendant des périodes allant de quelques jours à quelques semaines. Les conséquences de l'action de ces anticorps dans le cerveau de la souris seront établies par une analyse histologique des cerveaux. On s'attend à une neuro-inflammation du cerveau provoquée par des anticorps humains qui reconnaissent le récepteur nicotinique de la souris sur les cellules non-neuronales, comme les microglies et astrocytes, comme décrit par nos collaborateurs auparavant *in vitro*. Actuellement, la souris est le seul modèle expérimental qui permet ce type d'analyse. Le planning des expériences a été optimisé avec un logiciel disponible pour appliquer la règle des 3R.

Spécifiquement, le fait que le récepteur nicotinique de la souris est reconnu par les anticorps humains a été validé *in vitro*, sur des cellules cultivées contenant le récepteur de la souris, et de l'Homme. Seuls les anticorps qui reconnaissent le récepteur de la souris seront infusés. Ceci réduit le nombre de groupes à tester. On a aussi développé une technique biochimique pour identifier les anticorps humains qui reconnaissent au mieux le récepteur de la souris. Seuls ces anticorps avec haute affinité pour le récepteur de la souris seront infusés. Ceci réduit encore plus le nombre de groupes à tester.

Pour toute intervention chirurgicale, les souris seront anesthésiées (mélange de xylazine (Rompun® à 10mg/kg) - kétamine (Imalgène®) à 100mg/kg) dans du PBS 1X volume 1ml/kg). Une injection sous-cutanée d'analgique (buprénorphine 0,1mg/kg) est réalisée en plus, 30 minutes avant le début de la chirurgie. L'animal est placé sur une couverture chauffante pour éviter l'hypothermie. D'autres analgésiques (Métacam injectable, 1mg/kg/j) seront administrés avant le réveil, puis 24 heures après l'opération. Enfin, du Métacam buvable (1mg/kg/j) sera administré pendant les 3j suivants.

Enfin, on prévoit un groupe de 10 animaux pour optimiser et raffiner les procédures d'infusion et d'analyses.

8369 Malgré de nombreuses avancées, le cancer reste un problème majeur de santé publique et les traitements proposés aux personnes atteintes par cette maladie sont souvent lourds et engendrent de nombreux effets secondaires. Pour tenter d'améliorer l'efficacité ainsi que la tolérance aux traitements anticancéreux, les thérapies ciblées sont de plus en plus développées afin d'obtenir des traitements plus spécifiques des cellules tumorales. Dans cette optique, les nano-médicaments ont fait leur apparition comme outils thérapeutiques permettant un ciblage des tumeurs. En effet, il a été prouvé que les nanoparticules, telles que des micelles, s'accumulent au niveau des tumeurs. Par ailleurs, les nanoparticules ont la capacité d'encapsuler en leur cœur des composés tels que des agents anticancéreux permettant ainsi d'améliorer leur efficacité anti-tumorale tout en réduisant leur toxicité sur les tissus sains. Cependant, malgré ces caractéristiques intéressantes, force est de constater qu'aucune formulation d'agents anticancéreux sous forme de micelles n'a obtenu d'autorisation de mise sur le marché à ce jour. Deux points particuliers peuvent être soulignés pour expliquer ce constat : i) l'accumulation intra-tumorale n'est pas totale et une partie des micelles s'accumule également dans des organes périphériques tel que le foie ce qui peut induire des effets secondaires et ii) le relargage du médicament n'est pas contrôlé et se fait de façon passive et lente ce qui peut limiter l'efficacité thérapeutique.

Pour essayer de contrer ces problèmes nous avons développé des micelles décomposables sur commande permettant de libérer de façon contrôlée et massive un principe actif. Cette décomposition est provoquée par interaction avec un déclencheur que nous avons également développé et qui a la particularité d'être actif uniquement dans le microenvironnement des tumeurs. Ainsi, selon notre hypothèse, l'interaction entre la forme active du déclencheur et les micelles ne pourra se faire qu'au niveau de la tumeur. Afin de prouver le concept, nous testerons d'abord cette stratégie avec un

composé fluorescent, visualisable par imagerie, encapsulé dans les nanoparticules et dont la fluorescence est réduite à l'intérieur des micelles. L'ajout du déclencheur permettra de provoquer la décomposition des micelles et nous devrions alors observer un important allumage fluorescent de la tumeur qui fera suite à la destruction des micelles.

Les données recueillies lors de nos précédentes expériences ont été utilisées pour affiner au mieux les procédures expérimentales. Par une approche statistique, la « Règle des 3R », a été prise en compte afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaires à l'expérimentation tout en assurant un nombre suffisant permettant une étude convaincante qui ne nécessitera pas de reproduire ces expériences (réduire). Les conditions d'expérimentation et d'élevage sont optimisées (groupe de 5 souris, nid, jouets, etc.) afin de s'assurer du bien-être des animaux tout au long des procédures expérimentales (raffiner). Afin de réduire le stress des animaux généré par les expérimentations, ces dernières seront réalisées sous anesthésie gazeuse (isoflurane). Par ailleurs, en cas d'apparition de douleurs chez les animaux une administration d'analgésique (buprénorphine) sera réalisée. Afin de pouvoir étudier la capacité de notre technologie à détecter les tumeurs chez des animaux, nous ne sommes pas capables de remplacer l'expérimentation animale sur souris par d'autres alternatives in vitro (remplacer).

Ainsi, ce projet sera composé de deux procédures expérimentales. Dans la première, nous étudierons la bio-distribution des micelles fluorescentes et dans la seconde nous tenterons de décomposer ces micelles et de libérer la fluorescence in situ, dans la tumeur, par administration d'un déclencheur actif uniquement au niveau de la zone tumorale. Au total, ce projet nécessitera 80 souris (20 pour la première procédure et 60 pour la seconde).

8370 Un tissu adipeux sain est nécessaire au bon fonctionnement de l'organisme, en particulier en ce qui concerne le métabolisme, la régulation hormonale et la fertilité, et la thermorégulation. Lors de régimes alimentaires mal équilibrés, plus particulièrement les régimes riches en graisse, la masse adipeuse augmente et devient inflammatoires. Ce tissu adipeux inflammatoire, typique de l'obésité, est un tissu dysfonctionnel qui n'est plus à même d'effectuer ses fonctions régulatrices dans l'organisme. Dans ces conditions, le tissu adipeux devient une cause majeure de problèmes métaboliques, menant au développement de maladies chroniques comme les maladies cardiovasculaires et le diabète de type 2. La fréquence de ces pathologies est plus importante chez les patients en surpoids.

Le tissu adipeux est formé de cellules matures, les adipocytes, qui stockent les lipides. Lors de régimes riches en graisse, on observe une augmentation importante du nombre d'adipocytes ainsi que des cellules inflammatoires dans le tissu adipeux. A terme, ceci mène à une fibrose du tissu, c'est-à-dire à la production d'un excès de matrice extracellulaire qui rigidifie le tissu et le rend non fonctionnel. Les mécanismes biologiques impliqués sont très peu compris. Ce projet a pour but d'étudier le rôle des cellules stromales, qui sont une source importante de matrice extracellulaire et de facteurs pro-inflammatoires, dans le remodelage du tissu adipeux et pathologies associées (inflammation, fibrose). Nous nous intéresserons plus particulièrement à certaines sous-populations de cellules stromales pré-adipocytaires, c'est-à-dire qu'elles ont la capacité de se différencier en adipocytes matures, et sont donc impliquées directement dans l'augmentation de la masse adipeuse lors des régimes riches en graisse. A moyen terme, ce projet vise à identifier des nouvelles cibles thérapeutiques dans le traitement des pathologies chroniques inflammatoires associées au surpoids et aux régimes riches en graisse des sociétés occidentales, comme les maladies cardiovasculaires, le diabète et le cancer.

Ce projet repose sur le recours à des souris de laboratoire consanguines dont le patrimoine génétique a été modifié afin de visualiser et d'étudier au niveau moléculaire les cellules stromales. La complexité du développement des pathologies inflammatoires ne permet pas, à ce jour, une approche expérimentale de remplacement in vitro. La souris est un bon modèle pour étudier ces questions car de nombreux outils existent qui permettent d'étudier en détail les mécanismes biologiques. Le nombre de souris nécessaires à ce projet a été réduit au maximum. Pour les cinq procédures qui seront mises en œuvre dans ce projet, nous estimons à 3690 (sur 5 ans), le nombre de souris nécessaires, en nous limitant aux seules expériences et répétitions indispensables pour atteindre des résultats significatifs. Nous utiliserons des souris mâles et femelles adultes qui ont entre 5 et 16 semaines. Tout au long du

projet, nous donnerons la préférence à des procédures non invasives lorsque c'est possible et aurons recours aux soins/analgésie nécessaires pour limiter la douleur. Les niveaux de sévérité attendus vont de légère à modérée, cependant toutes les précautions seront prises pour limiter leur inconfort et souffrance potentielle qui peuvent en découler.

8371 L'ischémie critique des membres (CLI) est une complication grave de l'artérite des membres inférieurs, pathologie qui affecte entre 27 et 30 millions de patients en Europe et aux Etats-Unis. L'incidence de l'artérite progresse avec le diabète, le tabac et le vieillissement de la population. Les personnes atteintes souffrent de claudication, d'ulcères et dans certains cas de gangrène. En cas d'échec de la chirurgie de revascularisation, 40% des patients atteints de CLI devront subir une amputation, le taux de mortalité annuel excédant 20%.

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) présentent un intérêt grandissant pour la médecine régénératrice et l'ingénierie tissulaire. Les principales sources de CSM chez les adultes sont la moelle osseuse, le tissu adipeux et la pulpe dentaire.

Les CSM présentent un grand intérêt thérapeutique et de nombreux avantages pour le traitement de pathologies vasculaires par formation de nouveaux vaisseaux. Elles pourraient constituer un complément, voire une alternative, à la chirurgie de revascularisation dans les cas d'ischémie.

L'objectif de l'étude est de quantifier l'effet de reperfusion in vivo, dans un modèle de souris d'ischémie des membres postérieurs, de trois (3) lots de cellules stromales mésenchymateuses (CSM) dérivées du cordon ombilical et administrées par injection intramusculaire. Un tel procédé comprend une étape destinée à augmenter le potentiel de revascularisation des CSM. Ces mesures sont destinées à établir une corrélation avec l'effet de revascularisation de ces mêmes lots de CSM mesuré par ailleurs par un test in vitro.

Le mode d'administration, le schéma d'injection et la dose ont été choisis en fonction de l'utilisation clinique envisagée. L'étude utilisera 62 souris immunodéficientes, à raison de 12 souris par groupe, ce nombre constituant le minimum requis (en évaluant les pertes à 40 % qu'elles soient dues à la mort des souris après chirurgie ou à une ischémie insuffisante (< 80 %)) pour satisfaire aux objectifs de l'étude sur la base des prérequis réglementaires et scientifiques.

Toutes les expériences seront conçues pour respecter le principe des 3R (réduction, raffinement et remplacement) pour l'utilisation des animaux en recherche.

Réduction : Le nombre d'animaux est réduit au strict minimum par calcul statistique – de plus, grâce au laser doppler, plusieurs mesures pourront être faites sur les mêmes animaux pour l'étude cinétique

Raffinement : La chirurgie sera pratiquée sous anesthésie générale. De la lidocaïne (analgésique) sera administrée localement par voie sous-cutanée pendant 3 jours post-chirurgie suivi d'une administration de paracétamol par voie orale si nécessaire pour prévenir toute souffrance inutile. De l'enrichissement sera ajouté dans la cage au moment du change et de la nourriture sera mise à disposition après la chirurgie afin de favoriser la récupération. Les animaux seront surveillés quotidiennement et pesés à minima une fois/semaine. Leur entretien sera effectué dans des conditions soigneusement contrôlées pour s'assurer qu'il n'y a aucun signe de stress.

Remplacement : des expériences préliminaires in vitro ont été réalisées afin de produire des CSM à fort potentiel de développement endothélial.

Les résultats de l'étude chez l'animal seront intégrés dans une demande d'autorisation d'essai clinique de phase I/IIa, visant l'évaluation de la tolérance locale et systémique d'implantations de CSM allogéniques chez des patients présentant une ischémie critique d'un membre inférieur, ainsi que la recherche de signes d'efficacité.

8372 Chez l'homme les maladies artérielles périphériques (PAD) des membres inférieurs sont généralement consécutives au développement de lésions d'athérosclérose associée à de la thrombose. Ceci conduit à un rétrécissement et à une obstruction totale ou partielle des artères irriguant les jambes. La prévalence de cette maladie est environ 10% à 55 ans et atteint jusqu'à 40% chez les sujets de plus de 80 ans. Chez l'homme le déclenchement et l'aggravation de la maladie sont associés à des facteurs de risque comme l'âge, le tabagisme, l'obésité, le diabète etc... La

symptomatologie associée à cette pathologie va de la douleur au repos et à la claudication intermittente dans les cas les moins sévères, jusqu'à l'ulcération artérielle et la gangrène pour les cas d'ischémie critique des membres inférieurs. Les patients affectés par cette maladie présentent une mobilité fortement réduite, un risque réel d'amputation et une probabilité très élevée de subir d'autres événements cardiovasculaires (infarctus, accident vasculaire cérébral). Des interventions chirurgicales (pontage) sont possibles pour revasculariser le membre atteint. Toutefois le succès définitif de ces interventions n'est pas garanti et le besoin thérapeutique reste important.

Ce projet décrit la procédure envisagée par notre groupe pour caractériser in vivo le potentiel thérapeutique de nouvelles molécules dans le traitement des pathologies liées aux maladies artérielles périphériques.

Dans ce domaine, la recherche de nouveaux traitements est initiée in vitro, sur des cellules d'intérêt (cellules endothéliales, cellules musculaires lisses vasculaires, monocytes...) d'origine humaine ou animale. Elle a pour objectif de fournir des indications sur la manière dont les nouveaux produits agissent sur les mécanismes et les cibles impliqués dans les différentes phases de la pathologie. Cette étape in vitro permet de sélectionner les produits actifs. Comme aucun système cellulaire ou bio-informatique ne peut reproduire la complexité d'un organisme qui est le siège de régulations variées, complexes et pas nécessairement bien appréhendées, il devient incontournable de tester ces produits in vivo.

Notre objectif est alors de tester chez le rongeur les candidats médicaments efficaces in vitro en utilisant un modèle animal d'ischémie chronique des membres inférieurs. L'ischémie sera induite chirurgicalement et possiblement associée à un des facteurs d'aggravation décrits plus haut (le diabète) afin de renforcer la valeur prédictive du modèle. L'efficacité des traitements sera évaluée en surveillant l'évolution temporelle (longitudinal) des paramètres physiopathologiques altérés dans le cadre de cette maladie (par exemple la performance musculaire, les caractéristiques de la marche).

La coordination entre toutes les spécialités impliquées dans les études (modélisation in silico, pharmacocinétique, formulation, biochimie...), permettra de définir pour chaque nouveau candidat médicament des protocoles optimisés afin de réduire le nombre d'études in vivo.

Le département de bio-statistiques apportera sa contribution dans l'élaboration du design expérimental, afin d'optimiser le nombre d'animaux utilisés dans les études (en fonction de l'objectif de l'étude, de son design, de la variabilité des paramètres mesurés, de la taille des effets à mettre en évidence et de l'historique des données) et pour effectuer ou revoir les analyses statistiques.

La procédure décrite dans le projet est validée par le comité d'éthique. Les études réalisées au sein du centre de recherche sont encadrées par des recommandations internes et européennes, intégrant tous les aspects relatifs à l'utilisation des animaux (origine, hébergement, soins, manipulation, expérimentations) et la prévention de la douleur et du stress. Tous les expérimentateurs ont suivi les formations réglementaires nécessaires à la pratique de l'expérimentation animale. Ils sont ainsi formés aux gestes impliquant la manipulation des animaux, et l'observation des signes cliniques fondamentaux. Des critères d'alarme spécifiques essentiellement basés sur les signes cliniques d'ischémie des membres inférieurs ont été clairement identifiés (prostration, sur-toilettage, perte de poids, nécrose des orteils).

Le nombre maximal d'animaux qui devraient être utilisés dans le cadre de ce projet est de 6000 rats et 6000 souris sur 5 ans.

8373 Les maladies vectorielles sont des maladies infectieuses transmises par des arthropodes hématophages (insectes ou acariens) qui assurent une transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré vers un autre vertébré. Ces arthropodes transmettent des maladies parasitaires, bactériennes ou virales qui impactent de façon majeure les pays tropicaux et subtropicaux. Le changement climatique aura sans nul doute des conséquences importantes dans la répartition géographique des vecteurs de ces maladies qui devraient toucher des populations encore indemnes, notamment dans l'hémisphère nord, d'où la possibilité d'émergence potentielle de certaines maladies virales (chikungunya, dengue, zika.) ou parasitaires (paludisme). A l'exception de quelques-unes d'entre elles, on ne dispose pas de traitement préventif ou curatif, et la lutte dirigée contre les vecteurs est compliquée par l'apparition de résistance aux insecticides les plus courants.

La mise au point de nouvelles méthodes destinées à bloquer la transmission des maladies vectorielles nécessite de mieux comprendre l'interaction entre le microorganisme pathogène pour le vertébré sensible et l'arthropode qui l'héberge et le transmet. L'ensemble de ces expériences devrait permettre de développer de nouvelles approches pour lutter contre la transmission des maladies vectorielles.

Ce projet de recherche fondamentale vise à évaluer la capacité des moustiques à transmettre le microorganisme qu'ils hébergent en tant que vecteur. Pour cela, il est nécessaire :

- de disposer d'élevages de moustiques. Puisqu'il s'agit d'arthropodes hématophages, il faut qu'ils puissent effectuer un repas de sang. Dans le cadre des élevages, au laboratoire, qui sont indispensables à nos travaux sur la transmission de maladies virales, il n'existe actuellement pas d'autre solution optimale que de permettre aux femelles de moustiques de prélever du sang sur des souris anesthésiées. Plusieurs lots d'animaux sont utilisés alternativement afin de garantir la survie des souris dans des conditions optimales entre les différentes expériences de gorgement. D'après l'expérience commune, ce protocole expérimental ne devrait pas provoquer d'inconfort, contrairement à ce qui se passe dans d'autres espèces, mais si, de façon inattendue, de tels signes étaient observés un traitement analgésique tel qu'une pommade anti-inflammatoire quotane 0.2% sera appliqué sur les zones exposées aux piqûres.

- de les infecter de façon expérimentale, par repas sur du sang animal auquel les virus sont mélangés afin de mimer une infection naturelle. Le sang sera prélevé au niveau de l'artère auriculaire sur des lapins maintenus en captivité dans l'animalerie permet d'obtenir d'excellents résultats, reproductibles d'une expérience à l'autre, en comparaison avec le sang d'autres espèces animales qui peut être commercialisé (cheval, veau, cobaye). Les quantités de sang prélevées seront compatibles avec le poids de l'animal (22 ml pour un lapin de 4 kg). Les oreilles seront inspectées et toute lésion sera signalée aux animaliers. En cas de lésion, l'animal ne sera pas utilisé avant guérison totale.

Nous utiliserons dans le cadre de ces études le nombre minimal d'animaux nécessaires au maintien des élevages et aux expériences d'infection : 600 souris et 9 lapins sur une période de 5 ans. La sévérité de la procédure est légère.

8374 Au cours des infections bactériennes rencontrées chez l'homme, la progression de la résistance aux antibiotiques (bactéries multi-résistantes) est une problématique croissante, exposant les patients à des échecs de traitements, source de morbidité et de mortalité. Cette antibio-résistance est particulièrement marquée lors des infections respiratoires à *Pseudomonas aeruginosa* survenant chez les patients atteints de mucoviscidose et également chez les patients hospitalisés en réanimation. Chez ces derniers, la pneumonie acquise sous assistance respiratoire constitue la complication nosocomiale la plus grave où *Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli* figurent parmi les pathogènes les plus fréquemment rencontrés.

Devant ces problèmes d'antibiorésistance et le manque de nouveaux antibiotiques disponibles sur le marché, des alternatives thérapeutiques sont nécessaires. Parmi celles-ci, l'utilisation des bactériophages (virus infectant spécifiquement les bactéries) comme agents antibactériens représente une des solutions les plus prometteuses : c'est la phagothérapie.

L'efficacité de la phagothérapie pour le traitement des pneumonies à *E. coli* et *P. aeruginosa* ayant été démontré, nous souhaitons évaluer chez la souris l'innocuité ainsi que les modalités optimales d'administration d'un tel traitement. Il s'agit d'évaluer la capacité potentielle des bactériophages à déclencher eux-mêmes une réaction inflammatoire ou immunitaire chez l'organisme qui les reçoit, d'étudier les doses conférant la meilleure efficacité et la vitesse à laquelle les bactériophages sont spontanément éliminés (pharmacocinétique).

Le bénéfice attendu est une meilleure connaissance de l'innocuité de la phagothérapie, permettant in fine une utilisation optimale et sans risque chez l'homme.

Deux procédures expérimentales seront utilisées sur une durée de 5 ans, requérant un total de 1920 animaux : une procédure sévère (1440 animaux) et une procédure légère (480 animaux). Le nombre d'animaux nécessaire sera réévalué au cours de l'avancement du projet, par l'éventuelle réduction du nombre de points d'observation.

Dans la procédure sévère, les animaux seront infectés au niveau pulmonaire (sous anesthésie) puis traités. Cette infection pourra conduire au développement d'une pneumonie lorsque la souche utilisée

est pathogène. Le stress et la gêne respiratoire induits seront systématiquement pris en charge par un traitement morphinique précoce. Les effets du traitement par les bactériophages seront évalués après mise à mort des animaux à différents temps après l'infection, permettant notamment l'étude de l'inflammation dans le sang et dans différents organes ainsi que la numération des bactéries et des bactériophages.

Dans la procédure légère, les animaux ne seront pas infectés et l'administration du traitement par bactériophages constituera la seule intervention avant la mise à mort des animaux afin de déterminer la concentration des bactériophages dans les différents organes et le niveau d'une éventuelle réponse immunitaire.

Aucune alternative in vitro susceptible de répondre aux questions posées n'existe à ce jour.

8375 Dans les projets de recherche en Infectiologie animale ou humaine, de nombreux germes bactériens sont cultivés in vitro pour étudier leurs facteurs de virulence, pour conserver des souches d'agents pathogènes ou pour produire des inocula bactériens pour analyser cette virulence in vivo chez l'espèce cible. Certains de ces germes bactériens, comme *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus*, nécessitent d'être cultivés in vitro sur des milieux spécifiques, comme la gélose au sang frais de mouton. Pour produire ces milieux de culture indispensables pour la recherche en Infectiologie animale, il est nécessaire de collecter du sang frais sur mouton. Ce projet vise à collecter tous les deux mois en moyenne sur des brebis en fin carrière des poches de sang permettant de fournir en continu la quantité de sang nécessaire pour tous les projets de recherche en cours dans l'unité d'Infectiologie en Santé animale. Le sang frais de mouton contient des éléments nutritifs essentiels pour la croissance de ces germes, que d'autres milieux de culture n'ont pas. Il nous faudra 30 brebis en fin de carrière sur 5 ans, soit 6 brebis par an pour un service en continu.

Remplacement et réduction : en l'absence de méthode alternative pour collecter du sang nécessaire à la cultures de bactéries pour des projets de recherche, le nombre d'animaux inclus dans le protocole a été déterminé grâce aux retours d'expériences réalisées précédemment. Raffinement : il y aura un enrichissement social (vie en groupe dans une stabulation d'élevage pour ovins, la visite 2 fois par jour des animaliers) et de structure (paille et de pierre de sel).

8376 Le présent projet a pour but de déterminer l'influence du tissu adipeux sur le traitement des cancers. Le tissu adipeux correspond à un tissu humain normal introduit par voie sous-cutanée. Il est prévu que ce projet s'étale sur une durée de trois ans et la finalité sera d'appliquer les résultats à la clinique. En effet, il a été démontré que les personnes avec un indice de masse corporel (IMC) plus élevé présentent plus de risque de développer un cancer mais elles développeront également plus de résistance aux traitements. A la suite d'un projet précédent, nous avons démontré que le tissu adipeux protégeait les cellules de cancer du sein contre la molécule trastuzumab. Notre but actuel est de démontrer ce phénomène de protection pour le plus grand nombre de molécules et de cancers et d'en comprendre le mécanisme. Nous utiliserons quatre lignées de cancer du sein en fonction de leur sensibilité aux hormones, sensibilité qui peut être influencée par le tissu adipeux. Nous étendrons ensuite nos résultats aux lymphomes et aux myélomes en raison de nombreuses données émergentes à ce sujet dans ces cancers. Le but étant de mettre au point un modèle permettant d'évaluer la sensibilité des traitements en fonction d'un microenvironnement adipocytaire.

Les retombées attendues de ce projet sont la mise en évidence et la compréhension de ce type de résistance au traitement, ce qui permettrait d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancer en prenant en compte leur IMC et d'éviter les résistances aux traitements.

Cette étude sera réalisée sur souris immunodéprimées avec un effectif total prévu de 2496 souris

Dans un souci de respect du bien-être animal, nous pratiquerons la politique des 3 R, à savoir le remplacement, la réduction et le raffinement. Pour le remplacement, l'ensemble des molécules ont, tout d'abord, été testées in vitro sur des lignées cellulaires différentes. Les résultats de ces tests sont en faveur d'une résistance des cellules tumorales en présence d'adipocytes pour plusieurs molécules de manière statistiquement significative. Notre problématique s'inscrivant dans un domaine clinique, il nous paraît important de compléter ces résultats sur un organisme entier. En effet, les études chez la souris permettront d'évaluer la réelle efficacité d'un traitement ainsi que sa potentielle toxicité avant

d'envisager son application en clinique. Pour la réduction, la mise en place de ce projet sur 3 ans nous permettrait d'étudier plusieurs molécules sur divers types de cancer. Le fait de planifier sur un plus long terme et à plus grande échelle nous permettrait de mutualiser les groupes contrôles et de réduire l'effectif des groupes si le test devient suffisamment robuste. Enfin, pour le raffinement, des mesures préventives afin d'éviter la douleur seront mises en place avant la chirurgie, elle-même réalisée sous anesthésie générale. Elles seront suivies quotidiennement après la chirurgie et les mesures seront prises afin de soulager les douleurs ou gênes éventuelles. Les implantations de tissu adipeux et des tumeurs seront réalisées de sorte que l'animal ne soit pas gêné dans sa mobilité

8377 La peau fait partie des quelques tissus humains capables de régénération. La cicatrisation, phénomènes physiologiques naturels aboutissant à partir d'une plaie à la restauration de la structure cutanée, est divisé en trois phases : la phase inflammatoire, la phase de prolifération et la phase de remodelage.

Ce projet vise à évaluer l'efficacité thérapeutique de nouvelles stratégies dans des modèles de cicatrisation, d'une part sur la vitesse de cicatrisation et d'autre part sur l'impact sur la réponse inflammatoire.

Les phénomènes de cicatrisation étant complexe et faisant intervenir de nombreux partenaires cellulaires (système immunitaire), il est nécessaire d'utiliser des modèles précliniques intégrant l'ensemble de la biologie d'un organisme vivant. Ces modèles permettent de vérifier la faisabilité des thérapies, de détecter la survenue d'effets secondaires et possèdent une importance capitale lors du transfert en clinique.

Notre modèle de lésion excisionnelle murin est basé sur l'utilisation de punches à biopsies (plaies standardisées) associé à la greffe de disque de silicone (empêchant les phénomènes de contraction cutanées existant chez ces animaux mais pas chez l'homme).

Les lésions seront réalisées entre les omoplates de l'animal afin d'empêcher les animaux d'y toucher. Le suivi sera réalisé par observations cliniques et prélèvements histologiques. La mesure des dimensions de la plaie et la photographie étalonnée permettront d'apprécier l'aspect du tissu (eg. Changement de couleur, nécrose, ré-épithélialisation).

Pour chaque produit testé des doses « de référence » seront déterminées en fonction des résultats des tests in vitro et de la littérature. Les animaux seront soit non traitée (groupe contrôle), traités avec la dose de référence, une dose faible, ou une dose forte permettant de déterminer si :

- la dose « référence » est bien adaptée.
- la dose faible peut être aussi efficace
- une dose plus forte augmente l'efficacité.

Les animaux seront suivis régulièrement et différents critères seront examinés (annexe « Points limites »).

Ces modèles nécessiteront l'utilisation de souris immunocompétentes, hébergées en cages individuelles, pour éviter que les animaux touchent aux plaies entre eux, et sur portoir ventilé, pour limiter une contamination bactérienne aérienne.

Ce projet devrait nécessiter l'utilisation de 500 animaux.

Les résultats seront analysés par tests statistiques de comparaison permettant d'avoir une bonne idée de l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements.

Concernant la règle des 3R

Remplacer : Les traitements utilisés feront l'objet d'études in vitro préalables.

Réduire : Nous nous basons sur des travaux d'autres laboratoires internationaux qui travaillent avec des modèles de cicatrisation. Pour limiter le nombre d'animaux, les expérimentations seront réalisées en deux temps. Une phase avec des lots de 5 souris, permettant de vérifier l'efficacité potentielle des traitements, suivi d'une phase de validation (5 souris également), permettant de conforter cet effet. Des lots de 10 souris mettent en évidence les effets thérapeutiques intéressants et sont utilisés dans diverses publications.

Raffiner : Le suivi non-invasif (photographie) permet de faire un suivi cinétique non douloureux et est pertinent quant à la mise en place et la caractérisation des modèles de cicatrisation.

8378 Aujourd'hui, les différences concernant le devenir des médicaments dans l'organisme selon le genre, hommes ou femmes, sont encore mal connues. Les études de pharmacocinétique sont très majoritairement menées chez les hommes, si bien qu'il est difficile d'anticiper ou d'adapter les doses de médicaments chez les femmes.

Chez les femmes, la grossesse ajoute de nouvelles spécificités à la pharmacocinétique qui compliquent la prise en charge médicamenteuse des femmes enceintes. De plus, la prise de médicaments chez la femme enceinte induit un risque d'exposition fœtal dont il faut impérativement mesurer l'importance et les conséquences pour le déroulement de la grossesse et le développement de l'enfant.

La prise en charge de maladies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies infectieuses ou les pathologies neuropsychiatriques comme l'addiction pourrait être améliorée par une meilleure connaissance des paramètres qui conditionnent le devenir du médicament dans l'organisme : la pharmacocinétique. Cela permettrait notamment d'adapter les doses et les modalités de prise des médicaments afin d'en améliorer la tolérance et l'efficacité, dans un objectif de médecine personnalisée. Il est donc important d'identifier les singularités qui pourraient expliquer des différences pharmacocinétiques entre les hommes et les femmes. Chez les femmes, la grossesse s'accompagne souvent de modifications de la pharmacocinétique des médicaments dont les mécanismes ne sont pas toujours bien compris.

Aujourd'hui, la pharmacocinétique clinique repose sur la mesure de la concentration des médicaments dans le sang. Pourtant, c'est bien souvent au niveau des organes et des tissus que s'exerce l'effet pharmacologique des médicaments. Les tissus sont souvent séparés du compartiment sanguin par des barrières biologiques dont le franchissement par les différentes molécules est difficile à prédire et à mesurer. C'est notamment le cas pour la barrière fœto-placentaire, dont le franchissement par des médicaments pourrait entraîner des effets pharmacologiques ou toxiques chez le fœtus.

L'objectif principal de cette étude est i) de mettre en évidence des différences de distribution tissulaire des médicaments entre mâles et femelles, et ii) d'estimer l'exposition tissulaire et fœtale par le médicament étudié lors d'une administration chez la mère. Les médicaments testés correspondent à des pathologies fréquentes chez la femme enceinte pour lesquels on manque d'informations concernant leur pharmacocinétique pendant la grossesse. Ce travail permettra d'identifier de nouveaux paramètres physiologiques qui pourraient expliquer certaines spécificités de la pharmacocinétique des médicaments liés au sexe ou à la grossesse.

Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humains : du point de vue physiologique, la gestation, la structure placentaire et les échanges materno-fœtaux sont très proches de ceux que l'on retrouve chez la femme.

Ce projet s'appuie sur des études préalables menées in vitro et chez le rongeur. Le recours au PNH est nécessaire du fait des différences notables sur le passage des barrières biologiques, notamment placentaire, ne permettant pas une extrapolation entre les rongeurs et les primates 2. Le nombre d'animaux de 12 (6 mâles et 6 femelles) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Les animaux seront nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Tous les animaux seront hébergés par paire ou en groupe, et les femelles après mise bas resteront avec leurs nouveau-nés dans leur groupe. L'étude est réalisée sur des mâles et des femelles (gestantes puis hors gestation).

La mise en œuvre de méthodes non invasives de suivi au cours du temps (techniques d'imagerie utilisées en médecine humaine) permet de réduire le nombre d'animaux. La biodistribution des médicaments sera estimée par imagerie utilisant un analogue radiomarké du médicament, dans différents organes chez le mâle, la femelle au cours et hors période de gestation.

Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (imagerie et prélèvement sanguin), les manipulations des animaux se feront sous anesthésie générale. Des critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus, ce qui

permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

8379 Les glioblastomes (OMS Grade IV) constituent les tumeurs primitives du système nerveux central les plus fréquentes chez l'adulte. Ces tumeurs d'origine gliale sont aujourd'hui de très sombre pronostic avec une survie médiane des patients à 15 mois après le diagnostic. La thérapeutique actuelle consiste, lorsque c'est possible, en une exérèse chirurgicale suivie d'un traitement de radio et/ou chimiothérapie. En dépit des efforts considérables portés ces dernières années sur la prise en charge des glioblastomes, force est de constater que la stratégie thérapeutique est en échec. Plusieurs facteurs interviennent pour expliquer cela.

Premièrement, les symptômes associés ne surviennent que lorsque la tumeur occupe déjà une place très importante dans le tissu cérébral. Ceci rend la prise en charge complexe et tardive. Il est donc nécessaire de développer des approches diagnostiques permettant une détection précoce de la pathologie.

D'autre part, les vaisseaux sanguins qui alimentent le cerveau sont imperméables à la plupart des molécules. On parle de ce phénomène comme une véritable barrière : la barrière hémato-encéphalique (BHE). Si la fonction première de ce mécanisme est bien de protéger le cerveau en condition normale, cela devient un problème en situation pathologique pour délivrer au cerveau des médicaments par voie sanguine. Dans le contexte d'une chimiothérapie, plusieurs études scientifiques ont aujourd'hui montré que, lors d'un traitement par voie générale, une infime partie seulement des médicaments parvient spécifiquement à la tumeur. Cela explique les très nombreux effets secondaires qui surviennent au cours des traitements et leur faible efficacité thérapeutique.

Au cours des 10 dernières années, la physique médicale a permis la mise au point d'émetteurs d'ultrasons (US) focalisés permettant d'ouvrir la BHE de manière localisée, contrôlée et transitoire.

Ce projet propose d'utiliser les US focalisés pour ouvrir la BHE, non seulement de manière à délivrer des médicaments administrés par voie sanguine dans le cerveau, mais aussi afin de permettre à des molécules d'intérêt qui sont présentes dans les territoires tumoraux et qui peuvent servir de biomarqueurs de « sortir » dans le compartiment sanguin dans lequel on peut les détecter par différentes techniques de biologie.

L'utilisation de 245 rats doit permettre d'aboutir à des résultats significatifs pour l'identification de biomarqueurs. Le recours à un modèle animal est indispensable pour cette étude dans la mesure où aucun modèle alternatif complexe n'est actuellement disponible pour répondre aux questions posées. Les expérimentateurs prennent en compte des effectifs suffisants pour conclure significativement quels que soient les aléas expérimentaux, tout en mutualisant les groupes témoins afin de réduire le nombre d'animaux concernés. Enfin, le recul important sur les modèles de tumeur chez le rat permet une prise en charge efficace de la douleur par des traitements antalgiques et le choix de points limites adaptés afin d'éviter toute souffrance animale.

8380 Les maladies vectorielles sont des maladies infectieuses transmises par des arthropodes hématophages (insectes ou acariens) qui assurent une transmission active (mécanique ou biologique) d'un agent infectieux d'un vertébré vers un autre vertébré. Ces arthropodes transmettent des maladies parasitaires, bactériennes ou virales qui impactent de façon majeure les pays tropicaux et subtropicaux. Le changement climatique aura sans nul doute des conséquences importantes dans la répartition géographique des vecteurs de ces maladies qui devraient toucher des populations encore indemnes, notamment dans l'hémisphère nord, d'où la possibilité d'émergence potentielle de certaines maladies virales (chikungunya, dengue, zika.) ou parasitaires (paludisme). A l'exception de quelques-unes d'entre elles, on ne dispose pas de traitement préventif ou curatif, et la lutte dirigée contre les vecteurs est compliquée par l'apparition de résistance aux insecticides les plus courants.

La mise au point de nouvelles méthodes destinées à bloquer la transmission des maladies vectorielles nécessite de mieux comprendre l'interaction entre le microorganisme pathogène pour le vertébré sensible et l'arthropode qui l'héberge et le transmet. L'ensemble de ces expériences devrait permettre de développer de nouvelles approches pour lutter contre la transmission des maladies vectorielles.

Ce projet de recherche fondamentale vise à évaluer la capacité des moustiques à transmettre le microorganisme qu'ils hébergent en tant que vecteur. Pour cela, il est nécessaire :

- de disposer d'élevages de moustiques. Puisqu'il s'agit d'arthropodes hématophages, il faut qu'ils puissent effectuer un repas de sang. Dans le cadre des élevages, au laboratoire, qui sont indispensables à nos travaux sur la transmission de maladies virales, il n'existe actuellement pas d'autre solution optimale que de permettre aux femelles de moustiques de prélever du sang sur des souris anesthésiées. Plusieurs lots d'animaux sont utilisés alternativement afin de garantir la survie des souris dans des conditions optimales entre les différentes expériences de gorgement. D'après l'expérience commune, ce protocole expérimental ne devrait pas provoquer d'inconfort, contrairement à ce qui se passe dans d'autres espèces, mais si, de façon inattendue, de tels signes étaient observés un traitement analgésique tel qu'une pommade anti-inflammatoire quotane 0.2% sera appliqué sur les zones exposées aux piqûres.

- de les infecter de façon expérimentale, par repas sur du sang animal auquel les virus sont mélangés afin de mimer une infection naturelle. Le sang sera prélevé au niveau de l'artère auriculaire sur des lapins maintenus en captivité dans l'animalerie permet d'obtenir d'excellents résultats, reproductibles d'une expérience à l'autre, en comparaison avec le sang d'autres espèces animales qui peut être commercialisé (cheval, veau, cobaye). Les quantités de sang prélevées seront compatibles avec le poids de l'animal (22 ml pour un lapin de 4 kg). Les oreilles seront inspectées et toute lésion sera signalée aux animaliers. En cas de lésion, l'animal ne sera pas utilisé avant guérison totale.

Nous utiliserons dans le cadre de ces études le nombre minimal d'animaux nécessaires au maintien des élevages et aux expériences d'infection : 600 souris et 9 lapins sur une période de 5 ans. La sévérité de la procédure est légère.

8381 Projet :

Le but de cette étude est de démontrer l'implication du gène STK11 dans la réponse aux traitements par l'Aflibercept et le Bevacizumab sur des xénogreffes de cancer colorectal humain HCT-116.

Pour cela nous allons injecter la lignée parentale HCT-116 ainsi que 3 autres lignées clonales de HCT-116 ayant une diminution du gène STK11.

Ce modèle cellulaire sera injecté à des souris ayant perdu leur système immunitaire. Ces cellules ainsi greffées, vont développer une tumeur à l'emplacement de l'injection.

Nous avons choisi le modèle des souris Nude car c'est le modèle le plus adapté pour ce genre d'étude, ces souris étant immuno-déficiente, elles ne rejettent pas les cellules humaines qui leur seront injectées. Dans ce cas la réaction du « non-soi » ne peut avoir lieu. Ces souris recevront quelques jours après l'injection des cellules tumorales, des traitements de médicament (Aflibercept ou Bevacizumab) et nous suivrons l'inhibition de la pousse tumorale au cours du temps et ainsi évaluer l'efficacité de ce médicament sur les différents modèles.

Nous mettons tout en œuvre pour respecter la règle des 3R : Réduction, Raffinement, Remplacement, en n'utilisant que la quantité minimale de souris pour avoir en final des résultats statistiquement satisfaisants. Les règles éthiques sont toujours respectées au cours de notre protocole et veillons à surveiller les points limites que nous nous sommes fixés.

Ces études ont déjà été mises en œuvres in vitro (remplacement) mais doivent également être étudiées in vivo puisque l'environnement d'une tumeur est ici pris en compte. Ce qui n'est pas envisageable dans une boîte de culture cellulaire.

A la fin de l'étude expérimentale, les animaux seront euthanasiés, les tumeurs prélevées pour poursuivre nos recherches sur l'action de nos médicaments au niveau des voies de signalisation au sein des tumeurs prélevées.

Au total, ce protocole nécessitera un effectif de 180 souris.

Nous nous attendons à ce que les clones déficients dans l'expression du gène STK11 aient une croissance de base plus importante que les cellules HCT-116 parentales et « vecteur vide » (utilisées comme contrôles) et également que ces clones ne répondent plus aux traitements par l'Aflibercept ou au Bevacizumab.

Type d'animaux : Souris NMRI-Nude Foxn1

Nombre d'animaux : Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 180 souris expérimentales pour une durée maximale de 5 ans. Le nombre d'animaux utilisés est le minimum requis pour atteindre l'objectif fixé en utilisant la stratégie expérimentale développée précédemment, reposant sur les principes de remplacement, de raffinement et de réduction décrit au 2° de l'article R. 214-105 : « règle des 3 R ». Ce nombre a été calculé après avoir établi des procédures expérimentales permettant de réduire au maximum les expériences chez l'animal.

Remplacement : Les études in-vitro déjà menées ont permis de sélectionner/affiner au mieux les conditions expérimentales du projet afin de réduire au maximum le nombre d'animaux impliqués dans cette étude. En effet, cette étude ne peut être conduite qu'in vivo car celle-ci prend en considération la tumeur, son environnement ainsi que l'ensemble des interactions mise en jeu. Ainsi, il n'y a pas de modèles alternatifs au modèle animal permettant de recréer l'ensemble des acteurs impliqués dans le développement tumoral et l'action des traitements proposés.

Réduction : Nous limitons au maximum le nombre d'animaux par groupe de façon à obtenir des résultats statistiquement fiables. A cause des variabilités inter-animales et intergroupes, un nombre trop restreint d'animaux engendrerait des résultats trop variables et non valides. De précédentes études déjà effectuées nous permettent de savoir le nombre de cellules à injecter afin de réduire le nombre d'animaux.

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, les procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable des résultats dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

8382 La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune qui affecte le système nerveux central. En induisant une destruction de la gaine de myéline, elle provoque des perturbations motrices, sensibles et cognitives chez les patients. Ces troubles progressent vers des handicaps lourds et irréversibles qui entraînent souvent un décès prématuré. Les traitements actuels permettent de réduire les poussées et améliorent la qualité de vie des patients, mais ils ne permettent pas de guérir de la maladie.

L'origine de la SEP reste encore mal comprise et il n'y a pas de mutation génétique qui puisse clairement être rendue responsable de cette maladie. Ceci complique largement la mise au point de traitements. L'objectif du projet présenté ici est de mieux comprendre certains mécanismes à l'origine de la SEP. Pour cela, nous allons envisager non pas des défauts de l'ADN (mutations génétiques) mais des problèmes au niveau des protéines régulatrices à la surface de l'ADN (niveau épigénétique) et pouvant être affectées par l'environnement. Ce sont ces informations que nous allons décrypter en utilisant un modèle souris de SEP.

546 souris seront utilisées sur 5 ans dans 2 procédures respectivement légère et sévère.

Le bénéfice attendu du projet est une meilleure compréhension des facteurs épigénétiques et environnementaux à l'origine de la SEP. Ceci permettra de mieux définir les cibles que devront avoir les futurs médicaments pour traiter les patients souffrant de SEP.

Dans ce projet, nous allons induire, chez les souris, une maladie qui ressemble à la SEP. Cette maladie est induite en immunisant les souris contre une forme de myéline. Les symptômes attendus sont ceux de la SEP avec en particulier une faiblesse, voire une paralysie des membres postérieurs. Ces expériences seront réalisées sur des souris nourries normalement ou recevant aussi dans leur nourriture des polluants environnementaux. Ces expériences seront aussi réalisées avec des animaux n'exprimant pas des régulateurs épigénétiques dont nous voulons connaître l'effet. Dans chaque cas, nous évaluerons la vitesse de mise en place de la maladie et la sévérité des symptômes.

Le recours à l'animal est nécessaire car la SEP est une maladie complexe mettant en jeu à la fois le système immunitaire et le système nerveux. En l'état actuel de nos connaissances, l'interaction entre ces deux systèmes ne peut pas être reproduite in vitro avec des cellules en cultures.

Le nombre d'animaux que nous estimons nécessaire repose sur notre expérience de la conception d'études de ce type. Nous consultons un biostatisticien avant chaque expérience pour être sûrs d'utiliser le nombre d'animaux le plus faible possible sans compromettre la validité des conclusions.

Le modèle de SEP que nous allons mettre en œuvre est très largement utilisé par la communauté scientifique et les stades de progression de la maladie sont clairement définis selon 5 niveaux. Ainsi, pour chaque expérience, les animaux seront mis à mort dès qu'une différence de stade de la maladie est constatée entre contrôle et point expérimental. Dans ce protocole, seul les injections peuvent éventuellement être douloureuses ; elles seront faites sous anesthésie. Les animaux immunisés seront isolés et surveillés de manière journalière. Quel que soit le résultat, les expériences seront arrêtées au plus tard au stade de paralysie des membres postérieurs. Avant les injections, les animaux seront hébergés en groupe. Dans tous les cas, les animaux seront hébergés avec une litière appropriée et des matériaux de nidification.

8383 Les effets des radionucléides sur l'environnement sont peu documentés. Le tritium est un élément rejeté par les centrales nucléaires dans le cadre du fonctionnement normal et qui une fois dans l'atmosphère peut se retrouver dans les écosystèmes aquatiques. Le but du projet est d'évaluer les potentiels effets toxiques du tritium sur les écosystèmes aquatiques. Le poisson zèbre, *Danio rerio*, modèle très utilisé dans la recherche toxicologique, a été choisi pour cette étude. Les effets du tritium seront évalués sur les stades larvaires, présentant une plus grande sensibilité. Plusieurs réponses physiologiques seront mesurées (immunotoxicité/inflammation, neurotoxicité, détoxification, génotoxicité, malformations, bioaccumulation dans l'organisme). Les réponses obtenues après contamination de larves au tritium seront comparées à celles obtenues après irradiation de larves à une source de césium, de façon à acquérir des éléments de réponse sur l'efficacité biologique relative du tritium.

Pour réaliser ces expérimentations, 60 femelles et 60 mâles seront utilisés afin de produire les larves qui seront contaminées. Le projet utilisera également 3000 larves produites au stade autonome, soit 3120 poissons ou larves autonomes au total.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, les protocoles expérimentaux sont établis avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour l'obtention de résultats exploitables statistiquement. Les conditions de soins et d'hébergement des animaux sont adaptées aux procédures réalisées afin de limiter au minimum la souffrance animale (suivi et observations des animaux).

8384 La peur est une réponse adaptative et transitoire exprimée lorsqu'un sujet est exposé à un danger. Cependant, la peur peut devenir élevée et continue en absence de danger, devenant alors un trouble psychiatrique dénommé anxiété. Cette pathologie constitue la condition psychiatrique possédant la plus forte prévalence. Selon un rapport de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2007, 10,7% des hommes et 14,5% des femmes en France présentent des troubles d'anxiété généralisés. L'anxiété représente ainsi un coût sociétal et économique majeur.

Une hypothèse prédominante des neurosciences propose que l'anxiété, qui est une peur pathologique, soit causée par un dysfonctionnement des circuits neuronaux qui contrôlent la peur physiologique. Bien que de nombreuses études d'imagerie cérébrale de patients supportent cette hypothèse, elle demeure incertaine, et les mécanismes cérébraux des troubles anxieux sont toujours méconnus.

Le projet actuel vise à définir la cartographie des entrées synaptiques du « cortex insulaire » ou « insula » qui est une région cérébrale impliquée dans les troubles anxieux par de nombreuses études d'imagerie fonctionnelle. Nous allons utiliser des techniques de neuroanatomie modernes, dans un modèle murin car il est largement utilisé pour l'étude des circuits de la peur physiologique et pathologique.

Ce projet est une prémisse à une étude postérieure ayant pour but de mettre en évidence des altérations des circuits de neurones qui contrôlent la peur physiologique dans des modèles d'anxiété chez la souris, à travers une analyse de la connexion entre les neurones des propriétés de ces connexions, et du profil d'expression génétique des neurones de ces circuits.

Remplacer : Le projet porte sur une analyse de la connectivité des neurones. Des méthodes telles que la culture cellulaire ne permettent pas la quantification des connexions neuronales in vivo qui sont au centre de nos travaux. Par ailleurs, cette étude repose sur l'utilisation d'un marquage par une molécule nécessitant le bon fonctionnement de la machinerie cellulaire de l'organisme. Par conséquent cette procédure doit être effectuée chez des animaux vivants.

Réduire : Nous avons réduit au strict nécessaire le nombre d'animaux pour avoir une analyse fiable (le nombre d'animaux estimé permet d'effectuer des tests statistiques paramétriques) et complète de la connectivité du cortex insulaire. Nous utiliserons ainsi 72 animaux sur un an.

Raffiner : Les animaux seront toujours hébergés en cages collectives, afin de limiter le stress dû à l'isolement. Les cages seront également enrichies en nids en coton. Une surveillance particulière sera adressée aux animaux en période péri-opératoire. L'acte chirurgical sera effectué dans des conditions de propreté maximales. Des antibiotiques et analgésiques seront administrés en cas d'infection ou douleur.

8385 La maladie d'Alzheimer est une des principales maladies neurodégénératives et représente un enjeu de société considérable au vu de l'allongement progressif de l'espérance de vie. En effet cette maladie, liée au vieillissement, se caractérise par des troubles moteurs, mnésiques et cognitifs extrêmement invalidants. Des recherches sont menées au niveau moléculaire pour mettre au point des thérapies qui empêchent la dégénérescence, aux stades précoces de la maladie. Mais pour une prise en charge plus tardive, une fois que certains neurones ont dégénéré, il est indispensable de comprendre pourquoi les neurones encore disponibles ne remplissent plus leur fonction, afin de permettre la mise au point de thérapies qui suppléent les neurones défectueux pour restaurer un fonctionnement normal des circuits neuronaux encore présents.

En effet, deux facteurs essentiels sont à considérer. Le premier est que la neuro-dégénérescence est progressive mais pas homogène. Elle touche en priorité certaines catégories de neurones, ce qui va affecter le fonctionnement de circuits impliqués dans des fonctions spécifiques comme par exemple la mémoire ou la régulation de l'humeur. Le deuxième est que les circuits neuronaux sont interdépendants, de sorte qu'un déficit dans un circuit peut entraîner un dysfonctionnement d'un autre circuit. L'objectif de ce projet est donc d'examiner les altérations du fonctionnement des circuits neuronaux dans différents modèles de la maladie d'Alzheimer, dans la perspective de comprendre les mécanismes neuronaux qui font que certaines fonctions cognitives sont plus spécifiquement affectées, et si possible comment les restaurer. Dans la mesure où la maladie d'Alzheimer est une maladie neurodégénérative progressive, il est également important de comprendre la façon dont elle évolue avec l'âge. C'est pourquoi nous évaluerons le fonctionnement neuronal à différents stades d'évolution de la maladie chez les souris, allant du stade précoce, asymptomatique, à l'état avéré, symptomatique.

Les avantages escomptés sont une meilleure compréhension du fonctionnement cérébral et de ses pathologies (notamment neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer), ce qui représente un intérêt sociétal considérable. Les dommages escomptés sont d'une façon générale l'élevage et l'euthanasie prématurée de souris à des fins de recherche, c'est à dire dans des conditions artificielles et monotones par rapport à une vie sauvage ou domestique.

Ce projet respecte les principes de remplacement, réduction et raffinement.

L'étude des propriétés des circuits neuronaux impliqués dans la cognition nécessite l'observation et la manipulation de systèmes neuronaux intacts, et ne peut donc se faire que sur l'animal vivant. Il est en effet à ce stade de nos connaissances impossible de modéliser de façon réaliste le fonctionnement cognitif in vitro ou in silico. Nous avons opté pour l'utilisation de la souris car elle présente le meilleur équilibre entre les bénéfices (accessibilité expérimentale et pertinence par rapport aux pathologies chez l'homme) et les dommages escomptés (souffrance liées aux conditions d'élevage ou d'expérimentation).

Le nombre d'animaux nécessaires pour garantir un pouvoir statistique suffisant pour chacune de nos expériences est ici de 960 souris, réparties sur une période de projet de 5 années.

Les animaux utilisés sont des souris transgéniques, modèles de la maladie d'Alzheimer. A partir de l'âge de 3-4 mois, les souris de ces lignées expriment des déficits cognitifs de plus en plus marqués,

susceptibles d'altérer leurs conditions de vie. Toutefois, même si l'inconfort est difficile à évaluer chez la souris, aucune étude à notre connaissance ne montre que les troubles associés au développement de la pathologie soient douloureux pour l'animal avant un stade avancé de dégénérescence, et le phénotype n'est donc pas considéré comme dommageable avant un âge plus avancé (>10-12 mois) que l'âge maximum des animaux utilisés dans notre projet (6-7mois). Des éléments de distraction (les animaux sont élevés en cages collectives, autant que possible, selon des normes qui respectent leur besoin d'interactions sociales, et le milieu est enrichi avec du matériel de construction du nid) sont introduits dans les cages d'élevage pour pallier à la monotonie des conditions d'élevage en laboratoire. Pour prévenir, détecter et corriger les conditions de mal-être éventuel, les animaux sont suivis de façon très régulière par du personnel spécialisé, formé et sensibilisé au bien-être animal.

8386 A l'heure où les recommandations de bonnes pratiques nous interdisent, à juste titre, l'enseignement initial de la chirurgie sur les patients, nous organisons des formations pratiques en chirurgie et pratiques interventionnelles pour les jeunes chirurgiens en proposant un apprentissage intégré.

L'objectif est de faciliter l'acquisition des compétences techniques nécessitant l'utilisation d'une machine de Circulation Extra-Corporelle (CEC classique ou ECMO – Extra-corporeal Membrane Oxygenation), répondant parfaitement aux besoins de simulations nécessaires à une formation pratique initiale et continue. Ces formations s'adressent à un large public de professionnels de santé (internes, étudiants IBODE, chirurgiens seniors, anesthésistes, perfusionnistes...) et se développent de façon progressive et intégrée dans différents laboratoires :

1) le laboratoire de simulation, qui offre un entraînement sur simulateurs de chirurgie (pelvi-trainer, simulateur robotique Da Vinci), et permet un apprentissage préalable de la gestuelle sur simulateur.

2) le laboratoire de chirurgie ouverte et de laparoscopie sur grands animaux (porcs), permet la formation initiale des internes, et continue des chirurgiens praticiens sur un modèle permettant un enseignement des techniques chirurgicales et interventionnelles dans des conditions physiologiques quasi équivalentes à la clinique humaine.

3) Enfin, le laboratoire d'anatomie complète l'offre de formation en permettant un apprentissage dans de véritables conditions anatomiques humaines.

Le projet développé ici est un projet de formation par palier à la circulation extracorporelle en chirurgie thoracique cardio-vasculaire sur modèle porcin. La formation s'effectuera de façon progressive et intégrée : de façon à réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, l'apprentissage sur modèle porcin constituera la dernière étape de la formation

après un apprentissage théorique des 7 étapes de la circulation extracorporelle, des sessions de e-learning (simulation informatique) et un apprentissage au laboratoire d'anatomie.

Le modèle porcin est bien évalué et présente des similitudes dans son anatomie et sa physiologie avec l'Homme. Déjà validé pour des modèles d'entraînement chirurgical pour plusieurs spécialités, il permet aux jeunes chirurgiens d'acquérir en conditions réelles les qualités gestuelles nécessaires pour appréhender les interventions chirurgicales chez l'homme.

Le nombre maximum estimé d'animaux (porcs) nécessaire à cet enseignement est de 80 animaux pendant 5 ans. De façon à remplacer et réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés, différentes phases de l'apprentissage sont développées en amont aux laboratoires de simulation et d'anatomie. De plus les différentes procédures d'apprentissage sont réalisées le même jour sur un même animal par plusieurs chirurgiens en formation. Selon leur taille, les animaux peuvent être hébergés par 1, 2 ou 3 par boxes, au sein d'une même pièce. De façon à diminuer le stress, la souffrance et la douleur, toutes les procédures sont réalisées chez ces animaux sous anesthésie générale et un traitement analgésique leur est donné de façon adaptée en fonction de la procédure.

8387 Les accidents vasculaires cérébraux (AVC) sont la 2ème cause de mortalité dans le monde, et l'une des causes majeures de handicap acquis. Environ 80% des AVC sont dits ischémiques, c'est-à-dire induits par une interruption de la perfusion sanguine cérébrale. La majorité des AVC ischémiques est liée à l'occlusion d'une artère cérébrale par un caillot (thrombus) transporté par la circulation sanguine jusqu'aux artères cérébrales (embolie cérébrale). La reperfusion du tissu cérébral peut être réalisée pharmacologiquement à l'aide d'un traitement thrombolytique. A l'heure actuelle, le rt-PA (Altéplase)

est le seul médicament thrombolytique ayant reçu une autorisation de mise sur le marché dans l'indication de la phase aiguë de l'AVC ischémique thromboembolique. Ce traitement possède de nombreuses limitations : fenêtre thérapeutique courte, efficacité limitée chez 50% des patients, neurotoxicité, risque de transformation hémorragique.

Notre laboratoire a développé un modèle d'AVC utilisant des thrombi (caillot de sang) chez le Rat représentatif des AVC chez l'Homme ; en effet ce modèle a été utilisé en phase préclinique de développement de nouveaux thrombolytiques. Ce modèle présente néanmoins une variabilité importante en ce qui concerne les résultats obtenus lors des évaluations comportementales ou des observations de lésions cérébrales post-mortem. En effet l'intensité des déficits observés s'échelonne entre les troubles de la posture et de la locomotion jusqu'à l'hémiplégie et les lésions sont de tailles variables. Cette variabilité entraîne l'utilisation d'un nombre important d'animaux par groupe afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables.

L'objectif de ce projet est de mieux définir les paramètres d'induction dans le but de contrôler le niveau de degrés de déficits ; pour cela nous souhaitons redéfinir la quantité et la taille des thrombi injectés afin 1) d'augmenter le nombre d'animaux présentant des troubles au cours d'une expérience et ainsi réduire le nombre total d'animaux utilisés, 2) de mieux contrôler l'intensité de déficits induits en provoquant majoritairement le niveau d'atteinte choisi au départ, 3) d'induire moins de mortalité dans les 48h premières heures suivant la thromboembolie, 4) de vérifier la sensibilité de ces différents niveaux de déficits au rt-PA.

A terme, ce modèle permettra l'évaluation in vivo des propriétés thrombolytiques de nouvelles molécules ; les études in silico ou in vitro ne permettant en effet pas de prédire l'efficacité d'un traitement dans le cadre d'une intervention visant par exemple à limiter la taille des lésions cérébrales au cours d'un AVC thromboembolique chez l'Homme. Le nombre et la complexité des mécanismes mis en jeu au cours de l'ischémie-reperfusion du tissu cérébral chez l'Homme ne sont actuellement pas modélisés par des méthodes alternatives, alors qu'ils sont présents de façon similaire chez le Rat (remplacement).

Au total, un maximum de 300 rats mâles Wistar sera utilisé pour ce projet. Ils seront placés à 2 par cage, dans des cages ayant une superficie de 1800 cm², dès leur arrivée avec une feuille de papier absorbant comme dispositif d'enrichissement. Sur la base de notre expérience du modèle précédent, le nombre de rat utilisé pour chaque étude sera réduit au minimum (réduction) garantissant une interprétation statistique et scientifique des résultats (raffinement).

Chaque rat sera soumis au maximum à 5 procédures : tout d'abord à un prélèvement de sang de 0,4 ml à une des veines de la queue pour préparer des caillots ou thrombi (P1), puis à l'induction sous anesthésie gazeuse de l'AVC par injection de thrombi de taille calibrée au niveau de l'artère carotide en direction du cerveau (P2) et la mise en place d'un accès au niveau des veines de la queue pour l'administration des traitements (P3). Le traitement sera administré par voie intraveineuse 2h après l'induction de la thromboembolie sur animaux vigiles (P3) pendant 1h par perfusion.

Des tests neurologiques sensorimoteurs seront effectués 24 et 48 heures après induction de l'AVC en plaçant les animaux un par un dans un dispositif expérimental (espace ouvert de 60x40cm avec mûr de 20 cm) pendant 10 minutes environ, dans une pièce attenante à l'animalerie, afin d'évaluer les déficits neurologiques (P4).

Pour les animaux ne présentant que quelques symptômes moteurs ou posturaux observés en cage d'élevage, un suivi de 3 semaines sera effectué afin de réaliser des tests neurologiques sensorimoteurs entre 1 et 30 jours après induction de l'AVC (P4). Ce suivi permettra de savoir comment évoluent les déficits comportementaux dans ce modèle et à terme de tester des molécules à activités neuroprotectrices.

Une surveillance soutenue des animaux sera réalisée au cours des 48 heures suivant l'induction de l'AVC. Tout animal présentant une crise de convulsion supérieure à 3 minutes ou une incapacité à se déplacer avec abolition des réactions aux stimuli extérieurs et une perte complète des réflexes posturaux à 2h ou une incapacité à se déplacer avec perte complète des réflexes posturaux à 24h, sera mis à mort en conformité avec les recommandations éthiques.

Les animaux seront placés à 2 par cage à leur arrivée puis en cage individuelle à partir de l'induction de l'AVC jusqu'à leur mise à mort afin de faciliter leur récupération de la chirurgie, de leur administrer

les traitements et de les surveiller. Les animaux disposeront d'une feuille de papier absorbant dans leur cage comme enrichissement (raffinement).

8388 Avec 200 millions de femmes touchées à travers le monde, l'ostéoporose arrive au second rang des problèmes de santé publique après les maladies cardiovasculaires. En France, près de 40% des femmes en situation de post-ménopause souffrent de cette pathologie. L'ostéoporose est caractérisée par une fragilité osseuse qui prédispose aux fractures. Les traitements de l'ostéoporose favorisent aujourd'hui des agents non hormonaux (bisphosphonates et modulateurs sélectifs des récepteurs aux œstrogènes ou SERM) qui induisent un ralentissement global du remodelage en réduisant la résorption osseuse.

L'os se renouvelle en permanence pour conserver ses propriétés mécaniques, et l'homéostasie osseuse dépend de l'équilibre d'action de deux types cellulaires : les ostéoblastes et les ostéoclastes qui sont respectivement responsables de la formation et de la dégradation osseuse. La communication entre ces deux types cellulaires est régulée sous le contrôle principal de 3 protéines, l'ostéoprotégérine (OPG), le récepteur activateur de NF- κ B (RANK) et le ligand du récepteur activateur de NF- κ B (RANKL). La liaison de RANKL à son récepteur RANK présent à la surface des précurseurs ostéoclastiques (et des ostéoclastes matures) stimule leur différenciation en cellules multinucléées, seules cellules capables de résorber l'os. OPG, secrété par les ostéoblastes, est un récepteur leurre pour RANKL. La formation du complexe OPG/RANKL inhibe l'interaction entre RANKL et RANK et conduit à un déséquilibre de la balance entre ostéoclastes et ostéoblastes et donc du remodelage osseux.

En conditions physiologiques normales les phases de formation et de dégradation du tissu osseux sont à l'équilibre. A l'inverse, le déficit en œstrogènes qui apparaît lors de la ménopause provoque un déséquilibre en faveur de la résorption associé à une accélération du remodelage osseux, et vient aggraver la perte osseuse naturelle qui survient avec l'âge. La carence en œstrogènes induit une augmentation de la production de RANKL par des ostéoblastes ainsi qu'une diminution de l'OPG, favorisant la différenciation ostéoclastique et la résorption osseuse. Il est donc nécessaire de développer des stratégies thérapeutiques contrôlant cette dérégulation. Le développement de molécules innovantes (petites molécules de ciblage alternatives aux anticorps) régulant le remodelage osseux ouvrent de nouvelles perspectives dans la conception de produits pharmaceutiques pour le traitement des maladies osseuses.

Un moyen thérapeutique potentiel pour inhiber le remodelage osseux consiste donc à inhiber spécifiquement l'interaction de la cytokine RANKL avec son récepteur RANK. Pour cibler RANKL, de courts peptides mimant l'action de l'OPG ont été conçus. OP3-4, un peptido-mimétique d'OPG empêche l'interaction entre RANKL et son récepteur RANK, modulant la voie de signalisation de RANK et modifiant ainsi la fonction biologique de RANK en formant avec lui un complexe inactif. OP3-4 inhibe ainsi l'ostéoclastogénèse *in vitro* et prévient la perte osseuse dans un modèle de souris ovariectomisées. Une stratégie thérapeutique complémentaire utilisant des petites molécules de nature protéique, inhibitrices de RANKL pour bloquer l'interaction RANKL-RANK a été développée dans le laboratoire. Plusieurs molécules ont été identifiées comme inhibiteurs potentiels de l'activité RANK-RANKL, et leur activité anti-résorptive sur l'ostéoclastogénèse ainsi que leur effet sur l'expression des marqueurs ostéoclastiques a été ensuite testée *in vitro*.

L'objectif de ce travail est donc de développer des protocoles thérapeutiques anti-résorption osseuse avec les molécules les plus actives résultants de nos études *in vitro* dans un modèle murin d'ostéoporose induite.

Pour répondre à l'objectif de ce travail, le modèle animal retenu est le modèle murin C57BL/6 ovariectomisé. Ce modèle présente une perte osseuse mimant au mieux l'ostéoporose humaine ne pouvant être remplacé par une alternative *in vitro*. Cependant les expérimentations sont réalisées avec un nombre d'animaux réduit mais suffisant pour obtenir des données significatives. Le nombre d'animaux total est de 1344 pour une période de 5 ans. Les animaux sont hébergés dans des cages avec un nombre maximal de 5 et dans un environnement enrichi afin de préserver le bien-être animal. De plus, la perte osseuse associée à l'ovariectomie n'induit pas de douleur et les administrations des molécules sont réalisées sous anesthésie ou contention afin d'éviter le stress et de préserver le bien-être animal.

8389 La trisomie 21 est le syndrome génétique le plus fréquent dans la population générale avec 1 naissance sur 700. Ce projet s'inscrit dans la recherche d'un traitement afin de diminuer l'impact de la présence de 3 chromosomes 21 sur le développement cérébral et la survenue d'un retard des acquisitions. Ce retard des acquisitions serait dû à une diminution du nombre de neurones cérébraux en périodes prénatale et périnatale suite à une exagération des mécanismes nécessaires à la bonne mise en place du système nerveux central. Agir sur le nombre de neurones pourrait donc permettre de diminuer le risque de déficience intellectuelle dans cette pathologie et de changer son pronostic. Le but est de trouver un traitement permettant de protéger les neurones en période périnatale lorsque la découverte de la maladie est réalisée à la naissance, ou de protéger le cerveau en période prénatale lorsque les parents décident de poursuivre la grossesse. L'objectif de ce travail est de tester en période prénatale et périnatale l'injection sous-cutanée du PIF, peptide initialement identifié comme étant d'origine embryonnaire et présentant des effets neuroprotecteurs, sur le nombre de neurones et les capacités motrices de souriceaux chez un modèle murin de la trisomie 21. Notre étude nécessitera 48 souris au total : 4 groupes de 12 souris femelles car l'étude statistique utilisée pour chaque expérience nécessite 12 portées par groupe. De plus, les différentes expérimentations pourront être effectuées sur des mêmes groupes de souriceaux dans la mesure où celles-ci se révèlent non invasives, non douloureuses et non stressantes pour l'animal. Une attention particulière sera portée au respect de la règle des 3R : réduire le nombre d'animaux comme expliqué précédemment, remplacer par des approches in vitro dès que cela est possible et « raffiner » les approches expérimentales... De plus les animaux seront surveillés de façon journalière afin de vérifier tout comportement anormal traduisant une souffrance, comme des signes de prostration ou d'agressivité.

8390 Le programme de recherche proposé a pour but de mieux comprendre le rôle physiologique de la protéine p16 dans l'homéostasie énergétique et ses conséquences pathologiques dans le développement de l'obésité, du diabète de type 2 et ses complications telles que les maladies du foie gras (stéatose hépatique, NASH et fibrose hépatique) et de tester des molécules à visées thérapeutiques telles que des agonistes de PPARalpha et/ou des inhibiteurs de SGLT2 (gliflozines) en utilisant des approches in vitro (culture primaire d'hépatocyte isolés de souris p16WT de la fratrie et p16KO) et in vivo (souris p16WT de la fratrie et p16KO). L'étude de l'homéostasie énergétique dans des conditions physiologiques et pathologiques nécessite des études sur organisme entier qui ne peuvent être réalisées que par le biais de modèles animaux adaptés. Le projet a été conçu avec un nombre minimal d'animaux nécessaire pour assurer sa validité scientifique et statistique qui est évalué à 1228 souris (534 p16WT et 694 p16KO) sur 5 ans. Les mâles seront utilisés dans nos expériences car ils sont plus sensibles métaboliquement au régime riche en graisses induisant l'obésité (prise de poids, variation des paramètres métaboliques, insulino-résistance). D'une manière générale, nous utilisons des groupes n=8 à 15 et nous utiliserons principalement des analyses non-paramétriques. Les souris seront hébergées dans un environnement enrichi (4 souris par cage ; présence de petite maison pour améliorer leur bien-être). Les différentes lignées utilisées dans nos procédures ne présentent aucun problème physique ou physiologique. Néanmoins, nous serons attentifs à observer si les animaux souffrent ou présentent un comportement anormal en lien avec le responsable du bien-être suivant les paramètres cliniques suivants, définissant les points limites :

-perte de poids de 20% pour les souris minces déterminée après pesée des animaux et pour une souris obèse perte de poids correspondante au maximum à 20% de perte de poids d'une souris mince correspondante (et, le cas échéant variations de l'ingestion de nourriture et d'eau) :

-apparence physique externe (pilo-érection, dos rond, signes d'infection, respiration anormale.)

-changement du comportement (hypoactivité, démarche anormale)

-réponses comportementales au stimulus externe

Les animaux présentant un de ces critères seront euthanasiés par dislocation cervicale après anesthésie gazeuse. Euthanasies réalisés dans une salle dédiée. Ce monitoring sera réalisé en lien avec le responsable du bien-être animal.

8391 La vessie est une barrière mucoale naturelle importante affectée principalement par deux maladies : les infections urinaires (50% des femmes de 18 à 50 ans auront au moins une infection urinaire et

40% des maladies nosocomiales en milieu hospitalier sont des infections urinaires suite à l'introduction d'une sonde urinaire) et le cancer de la vessie (l'un des cancers les plus fréquents affectant plus de 100 000 personnes en Europe). Le point commun entre ces deux maladies c'est l'introduction de bactéries dans la vessie lors de l'initiation de l'infection urinaire et lors du traitement des cancers de la vessie par une bactérie : le bacille de Calmette Guérin (BCG). Dans les deux cas, le système immunitaire semble impliqué dans le développement de la maladie et la réponse au traitement.

À l'heure actuelle, il existe un nombre limité de traitements pour ces deux pathologies. De plus, ces derniers ne sont pas efficaces à 100% et induisent des effets secondaires parfois néfastes et importants. Le but de notre projet est donc de comprendre le fonctionnement du système immunitaire dans ces deux pathologies afin d'améliorer les traitements existants et/ou en développer de nouveaux pour les patients afin d'éviter les rechutes et diminuer les effets secondaires indésirables.

Dans notre étude nous utiliserons des souris (mâles et femelles) de 8 à 16 semaines.

4697 souris seront utilisées sur 5 ans.

Ce projet fait appel à dix procédures expérimentales différentes dont le niveau de sévérité est modéré.

L'utilisation d'animaux (souris) est absolument nécessaire pour ce projet. En effet, il est nécessaire que les organes et les systèmes impliqués soient intacts afin de bien comprendre la migration cellulaire et la réponse immunitaire.

Le nombre de souris a été calculé afin de réduire au maximum le nombre d'animaux nécessaire à ce projet tout en atteignant les objectifs fixés.

Tous les efforts seront faits afin de réduire au maximum le stress, l'inconfort et la douleur des animaux. Dans le cas peu probable où le niveau de stress, d'inconfort et/ou de douleur observé chez un animal atteint les points limites (déterminés en accord avec la réglementation européenne), des mesures adéquates seront prises afin d'éliminer ou réduire au maximum le stress, l'inconfort et/ou la douleur des animaux utilisés.

8392 La lithiase rénale est un enjeu de santé publique car elle affecte 10% de la population. La plupart des calculs dépendent en grande partie de la concentration des urines en calcium. Un grand nombre de calculs rénaux se développent à partir de calcifications du tissu rénal nommées plaques de Randall. Des études cliniques récentes suggèrent que les apports importants en vitamine D, éventuellement associés à des apports de calcium importants, augmentent la concentration du calcium urinaire chez certaines personnes prédisposées et pourraient être associées au développement de ces plaques mais il n'y a pas de preuve actuellement. De plus, il a été retrouvé des quantités importantes de fluor dans des plaques de randall humaines (données non publiées), ce qui suggère que le fluor pourrait être un facteur important de la formation ou de la stabilisation de la plaque de Randall. Nous allons étudier l'influence de la vitamine D (avec ou sans apports calciques) et du fluor dans le développement de ces plaques à l'aide d'un modèle murin spécifique, le seul modèle de développement de plaques de Randall connu chez l'animal. Notre modèle et nos procédures expérimentales sont optimisés selon la règle des 3R. En effet, le modèle in vivo chez la souris est indispensable car il permet de générer des calcifications qui miment celles observées chez l'homme. Le nombre d'animaux sera réduit au minimum à savoir 6 animaux par groupe soit 48 animaux dans le modèle vitamine D (24 animaux génétiquement modifiés qui développent spontanément des plaques et 24 animaux type sauvage, répartis dans 4 groupes de 6 animaux : contrôle, vitamine D, calcium, calcium+Vitamine D) et 24 animaux dans le modèle fluor (12 animaux génétiquement modifiés qui développent spontanément des plaques et 12 animaux type sauvage, répartis dans 2 groupes de 6 animaux : contrôle et fluor). 72 animaux seront ainsi utilisés. Si les résultats s'avéraient limites en termes de significativité, 24 animaux supplémentaires pourraient être utilisés dans le modèle vitamine D et 12 supplémentaires dans le modèle fluor soit 36 animaux supplémentaires. Soit un nombre maximum d'animaux qui seront utilisés pour le projet : $72+36=108$ animaux. Ce nombre d'animaux est réduit au maximum selon la règle des 3Rs. Selon le principe de réduction, nous avons prévu d'utiliser le nombre minimal d'animaux en prenant en compte une puissance de l'étude de 90% et un risque alpha de 0.05 soit 6 animaux par groupe. Dans le cadre du raffinement, aucune intervention invasive ne sera réalisée jusqu'à l'euthanasie Il est attendu que la vitamine D, surtout avec ajout de calcium, ainsi que le fluor,

favorisent le développement des calcifications rénales. Toutes ces procédures seront réalisées selon la règle des 3Rs, afin de limiter l'étude au nombre minimal d'animaux, en utilisant le seul modèle disponible de plaque de Randall disponible chez l'animal et en optimisant les procédures. Il n'y a pas de modèle alternatif (replaces).

8393 La production et l'utilisation croissantes de plastiques et leur dégradation conduit à l'émission de fragments appelés microplastiques (MP) quand leur taille est dans la gamme 1-5000 µm. La toxicité des MP pour la faune reste mal connue, pour les poissons osseux, appelés téléostéens par la suite (par opposition aux poissons cartilagineux, chondrichthyens) des premiers travaux montrent néanmoins des perturbations physiologiques au cours du développement. Outre leur toxicité intrinsèque, il a été démontré que les MP pouvaient aussi être vecteurs pour des polluants organiques persistants (POP). Le présent projet a pour objectif d'étudier la toxicité des MP pour les organismes aquatiques en répondant aux questions suivantes : Quelles sont les conséquences physiologiques pour les téléostéens d'une exposition à des MP ? La toxicité des polluants organiques persistants adsorbés aux MP (MP-POP) est-elle uniquement due à ces polluants ou à la combinaison avec des MP ? La toxicité des MP et MP-POP sur une génération exposée peut-elle avoir des conséquences sur les performances physiologiques et le devenir des descendants ? Les effets seront analysés après expositions expérimentales par voie alimentaire à des microplastiques (liés à de l'aliment inerte ou vivant) nus ou sur lesquels des contaminants organiques persistants auront été adsorbés. Les approches utilisées allieront des analyses au niveau individuel (survie, croissance, comportement, reprotoxicité, embryotoxicité, tératogénicité) et infra-individuel (perturbation endocrinienne, expression de gènes, processus de détoxication). Les espèces utilisées seront des téléostéens modèles (médaka marin, poisson zèbre). Au total 10140 médakas et 5400 poissons zèbres seront utilisés dans ce projet soit 15540 individus sur 5 ans. Les effectifs ont été calculés à partir de données d'expérimentations précédentes et de la littérature pour assurer une puissance de détection suffisante des effets escomptés (Réduction). Pour réduire la souffrance et l'angoisse, les animaux sont manipulés uniquement sous anesthésie pour toutes les mesures individuelles, et sont toujours élevés en groupe dans des structures d'élevage adaptées à l'espèce avant et après l'application des procédures (Raffinement). Le Remplacement n'est pas possible dans le cas présent car nous étudions des fonctions intégratives des effets des microplastiques.

8394 Le choc septique (défaillance multi-viscérale survenant au cours d'une infection grave associée à un syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS) est un problème de santé publique majeur dont l'incidence augmente en pédiatrie et avec le vieillissement. Cette pathologie, dont la mortalité est comprise entre 30 et 70%, ne bénéficie d'aucun de traitement adapté et conduit à la mort de plus de 45 000 personnes par an en France. Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Le SIRS se caractérise par une « tempête de cytokines », notamment pro-inflammatoires et sa manifestation clinique inclut au moins 2 des critères suivants : une altération de la respiration, une dérégulation de la température, une tachycardie et un état hyper ou hypo-inflammatoire. Les traitements systématiques du choc septique se résument actuellement au remplissage vasculaire pour tenter de rétablir un débit de perfusion des organes suffisant à leur fonctionnement et une antibiothérapie pour contrer l'infection sous-jacente. Malheureusement ces traitements ne suffisent pas à diminuer la mortalité. A ce jour, les nombreuses approches thérapeutiques ciblées testées se sont avérées inefficaces dans le traitement du choc septique suggérant qu'une approche plus systémique serait plus efficace. Le développement de thérapies efficaces et l'amélioration de la prise en charge de l'adulte mais aussi des populations plus sévèrement touchées, les enfants, dépendent également d'une meilleure compréhension de la pathologie, de son développement, de la genèse des troubles cardiovasculaires (Tachycardie, hypotension, insuffisance cardiaque). L'inefficacité des anti-inflammatoires dans cette pathologie suggère que les dysfonctions des organes seraient dues à d'autres composés circulants, décrits ou non. Il devient donc urgent de développer de nouvelles thérapies efficaces pour la prise en charge du choc septique avec une approche systémique ou visant à bloquer les composés intervenant dans la mise en place d'effets toxiques, qui sont nos deux objectifs dans ce projet.

Partie 1 : Nos études antérieures sur deux modèles adultes de choc septique chez le rat, avec une approche non ciblée ont montré des effets bénéfiques généraux (cœur, reins, foie, métabolisme) et

ont permis d'augmenter la survie des animaux adultes. Les mécanismes cellulaires et moléculaires sous-jacents à ces améliorations ne sont pas connus à ce jour et sont en cours de recherche. Nous avons donc ici deux objectifs :

- Finaliser l'évaluation des mécanismes menant aux effets bénéfiques de notre approche thérapeutique.
- Transposer ce traitement chez un modèle jeune de rat permettra de confirmer l'utilisation de ce traitement chez le jeune, afin de pouvoir envisager une application également en pédiatrie où il y a une population à risque de la pathologie

Partie 2 : Le but dans cette étude est d'améliorer la compréhension de la pathologie et de mettre en évidence la présence de composés pouvant être utilisés à des fins thérapeutiques, diagnostiques ou permettant le suivi de la pathologie. Pour cela une étude non ciblée de l'ensemble des composés, connus et identifiés ou non, présent dans le plasma (secrétomique) des rats en choc septique sera effectuée. Pour cela la composition du plasma sera étudiée à différents stades de la pathologie et comparée à des prélèvements contrôles.

Le modèle animal de choc septique le plus adapté est ici le modèle d'injection de Lipopolysaccharide (LPS) chez le rat, très bien documenté et maîtrisé dans notre laboratoire. Il est simple, très reproductible avec une cinétique courte, documentée. La simplicité de la mise en place et la reproductibilité de ce modèle permettent un criblage des molécules efficaces en évitant la douleur générée par un modèle chirurgical.

Les expérimentations sont prévues pour Réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en ayant des données statistiques suffisamment puissantes afin d'éviter l'utilisation de nouveaux animaux, qui ne sera faite uniquement car le modèle n'est pas Remplaçable. Afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à Raffiner nos techniques et à limiter le nombre d'animaux utilisés. Afin de prévenir les souffrances et de ne pas altérer les résultats de l'étude, des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude. Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables (n=5-15 suivant les manipulations), le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer 305 animaux.

8395 Le bien-être animal est assuré par un environnement répondant aux besoins physiologiques des animaux et par une gestion optimale du stress ou de la peur ressentis par les animaux. La bonne réalisation des gestes techniques du personnel manipulant les animaux est donc garante du bien-être animal. En effet, plus les gestes d'administration et de prélèvement sont sûrs et précis, plus la durée de la contention est courte, et moins de stress, de peur ou de douleur sont ressentis par les animaux. La bonne réalisation des gestes d'administration et de prélèvement contribue donc au raffinement du principe des 3Rs.

La formation continue du personnel travaillant avec les animaux de laboratoire, dont l'objectif est de maintenir et de développer les compétences, est par ailleurs réglementée par l'arrêté du 1er février 2013 relatif à l'acquisition et à la validation des compétences des personnels des établissements utilisateurs, éleveurs et fournisseurs d'animaux utilisés à des fins scientifiques. Le personnel qui manipule les animaux de laboratoire doit disposer de compétences adaptées, en accord avec le respect du bien-être animal et avec la qualité optimale des résultats générés par les procédures expérimentales. Les compétences acquises et validées sont ensuite tracées dans un livret de compétences individuel reprenant la compétence acquise, la méthode d'acquisition, la date et la durée de la formation ainsi que la date de validation de la formation suivie.

Les animaux qui servent à l'apprentissage et à la validation de ces gestes techniques sont, dans la mesure du possible, des animaux précédemment utilisés dans des procédures expérimentales autorisées de classe de sévérité légère. Pour une partie de cet apprentissage, l'utilisation d'animaux vivants peut être remplacée par un entraînement sur des cadavres. La réutilisation d'animaux précédemment inclus dans des procédures expérimentales autorisées permet également de réduire le nombre d'animaux utilisés à des fins de formation. La bonne maîtrise des gestes techniques garantit

la réussite au premier essai des administrations et des prélèvements, ce qui diminue le nombre d'animaux utilisés pour les procédures expérimentales.

Le personnel est également formé aux gestes techniques d'administration et de prélèvements sur animaux anesthésiés, si l'anesthésie générale est compatible avec le geste technique à réaliser, puis sur animaux vigiles, si la procédure expérimentale nécessite de réaliser le geste sur animal conscient. Les formations sont assurées par des collaborateurs experts dans la réalisation de ces gestes. Le raffinement est également présent dans la mise à disposition d'enrichissements dans les cages (exemples : igloos, matériel de nidification, bâtonnet à ronger) et une surveillance clinique particulière pendant toute la durée de la formation. Si un animal présente un signe clinique anormal à la suite de l'apprentissage d'un geste technique, il sera euthanasié de façon à ne pas lui engendrer de souffrances inutiles.

Un effectif maximal de 400 souris, 500 rats, 80 cobayes et 20 lapins sur 5 ans est nécessaire pour la conduite de ce projet.

8396 La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative caractérisée par la perte des neurones produisant de la dopamine situés dans une région du cerveau appelée la substance noire. La dopamine est un neurotransmetteur essentiel pour le contrôle des mouvements volontaires et les apprentissages. Le traitement de la maladie de Parkinson est basé sur l'utilisation d'agonistes dopaminergiques qui ont pour but de pallier au manque de dopamine consécutif à la perte des neurones dopaminergiques. Ce traitement entraîne des effets secondaires appelés troubles du contrôle des impulsions qui se manifestent par des addictions comportementales telles que jeu pathologique, achats compulsifs ou consommation compulsive de nourriture. Les mécanismes responsables de ces effets secondaires sont mal connus. La flexibilité comportementale désigne la capacité d'un individu à adapter son comportement lors de changements de règles ou de situations de manière à effectuer des actions optimales (par exemple : changer de stratégie durant un jeu pour maximiser ses gains ou limiter ses pertes). Ce processus cognitif est notamment altéré lors de l'addiction aux drogues. Le but de ce projet est de déterminer si une altération de la flexibilité comportementale présente avant la lésion dopaminergique ou bien induite par la lésion et/ou le traitement antiparkinsonien pourrait contribuer au développement des effets secondaires des traitements pharmacologiques de la maladie de Parkinson.

Ce projet utilisera 60 rats et sera réalisé en application de la règle des 3R : Réduire : (i) nous avons rédigé un protocole expérimental rigoureux avant toute expérimentation, (ii) nous avons entrepris de réduire aux maximum le nombre d'animaux en planifiant uniquement des expériences qui nous semblent absolument nécessaires pour répondre aux objectifs scientifiques et en effectuant des mesures répétées. (iii) Nous mettrons en place des tests statistiques performants : ANOVA multi factorielle suivi de tests "post-hoc" de comparaison de moyennes de deux échantillons avec ajustement de l'erreur. Raffiner : (i) nous avons planifié nos expériences en apportant une attention particulière pour réduire sinon soulager l'inconfort, la douleur, la détresse ou l'angoisse subie par les animaux en utilisant un test de flexibilité comportementale qui ne requiert pas d'intervention directe de l'expérimentateur. Remplacer : Ces approches analysant le comportement de l'animal, il n'est pas envisageable d'utiliser des méthodes de substitution à l'animal entier.

8397 Le stockage de spécimens de sang de chien à température ambiante est connu pour entraîner des variations modérées de certaines variables hématologiques.

Chez le rat et la souris, les conditions de travail en laboratoire de recherche imposent des impératifs de stockage et de délais d'analyses des spécimens sanguins dont les répercussions sur les résultats d'analyses hématologiques ne sont pas encore connues. Nous chercherons à reproduire les conditions pré-analytiques et analytiques d'analyses de spécimens sanguins de rats et souris dans le cadre de travaux expérimentaux de recherche. Notre but est d'évaluer la stabilité cytologique des spécimens de sang soumis à différentes conditions de délais et température de stockage pour se rapprocher au plus près des conditions habituelles de travail d'un laboratoire de recherche.

Dix souris C57Bl6 et 10 rats Wistar, âgés et de réforme, seront anesthésiés tout le long de la procédure (anesthésie générale volatile) et après laparotomie, un prélèvement sanguin terminal sera effectué à la veine cave caudale et le sang obtenu sera versé sans délai dans un tube de 1ml (K3-

EDTA) par animal. Chaque tube sera aliquoté en 9 et 7 microtubes respectivement pour le rat et la souris : un microtube sera analysé dans les 2 heures maximum suivant la prise de sang et les 8 autres seront stockés soit à 4 °C soit à température ambiante (20°C) pour être analysés après 6, 24, 48 et 72 h chez les rats et après 6, 24 et 48h chez les souris. Les animaux seront euthanasiés sous anesthésie générale dès la fin de la procédure. L'euthanasie des rats sera mise à profit pour prélever plusieurs organes abdominaux afin d'enrichir la collection de lames d'histologie dédiées à la formation continue.

8398 Dans le cadre d'un projet bénéficiant d'une autorisation, sur le rôle du beta-Nerve Growth Factor (b-NGF) dans l'induction de l'ovulation chez la jument, nous avons mis au point une canulation des sinus caverneux. Cette méthode peu invasive ne nécessite qu'une tranquillisation de l'animal pour poser le cathéter dans la veine faciale. Cette technique nous a permis de mesurer des pulses de sécrétions de neurohormones qui ne sont pas mesurables dans le sang périphérique prélevé dans la veine jugulaire. Des variations de concentrations de neurohormones dans les échantillons prélevés sur plusieurs ponettes nous ont amené à nous poser la question de l'influence de la position de l'extrémité du cathéter dans le sinus caverneux sur les quantités de neurohormones mesurées. Nous souhaitons réaliser une imagerie par CT-Scan et angiographie des sinus caverneux avec le cathéter en place afin de mieux définir l'anatomie de ce système veineux particulier, de mettre en évidence, s'il y en a, une variabilité anatomique entre les individus.

10 animaux feront partie de ce projet : 10 peuvent suffire pour mettre en évidence une variabilité anatomique comme cela a été montré dans une étude chez la brebis,

La règle des 3R sera respectée comme suit :

Remplacement : il nous est impossible de répondre à cette question par des techniques in vitro. La vascularisation cérébrale est un phénomène dynamique non reproductible en dehors des organismes concernés.

Réduction : nous utiliserons le nombre minimal d'animaux pour répondre en nous basant sur une étude réalisée chez la brebis. Nous pensons utiliser 5 animaux minimum et nous augmenterons le nombre à 10 maximum si on observe une grande variabilité interindividuelle.

Raffinement : nous limiterons le stress des animaux en les isolant du troupeau au dernier moment et en leur administrant un sédatif rapidement. La technique chirurgicale est peu invasive et très bien supportée. Un anesthésique local sera injecté sous la peau en regard du cathéter. Un anti inflammatoire analgésique sera administré en post opératoire. Le retour en élevage avec les congénères sera organisé au réveil complet de l'animal et lorsque l'imagerie aura été réalisée.

8399 Les effets protecteurs des hormones sexuelles féminines (les œstrogènes) au niveau du cœur ont été montrés dans différentes études chez la femme et l'animal. Les effets des œstrogènes sont médiés par deux récepteurs. Mais à l'heure actuelle, l'ensemble des données de la littérature démontre qu'un seul de ces récepteurs (le récepteur des œstrogènes alpha) est nécessaire aux effets bénéfiques de ces hormones. En outre, les travaux antérieurs de l'équipe ont montré plus particulièrement que le récepteur au niveau de la paroi des vaisseaux est nécessaire pour la protection. Des études expérimentales ont montré une relation forte entre les maladies cardiaques et les altérations de la paroi des vaisseaux, notamment dans les sites où le flux sanguin est le plus important (à la sortie du cœur par exemple). Grâce à des modèles de souris, nous essayons de déterminer le rôle des récepteurs des œstrogènes présents au niveau de la paroi des vaisseaux dans la morphologie de ces cellules dans plusieurs territoires à la sortie du cœur.

Les effets des œstrogènes font intervenir des fonctions, tissus et cellules multiples dans l'organisme non modélisables par des approches in vitro, c'est pourquoi le recours à l'expérimentation animale est l'unique approche permettant de comprendre les impacts des œstrogènes. De plus, nous utilisons des animaux génétiquement modifiés. De la naissance à la mort, les souris sont hébergées selon les conditions de la directive européenne, régies par les principes de remplacement, de réduction et de raffinement (Règle des 3 R). Le nombre de souris utilisées (20 animaux / groupe) a été calculé pour donner des résultats statistiquement significatifs. Le bien-être de l'animal est bien pris en compte avec enrichissement du milieu, et toutes les expérimentations sont effectuées sous anesthésie générale.

La surveillance des animaux est quotidienne, par l'opérateur le premier jour de chaque intervention puis par les zootechniciens. Il peut arriver qu'un animal présente un amaigrissement excessif (>20%) associé à une prostration. Dans ce cas, l'animal est sorti de la procédure et euthanasié. 320 animaux seront utilisés dans ces procédures.

8400 L'hypothyroxinémie est une forme d'hypothyroïdie dans laquelle la concentration sanguine de T3 (l'hormone thyroïdienne active) est normale alors que celle de T4 (précurseur de T3) est diminuée. Cette anomalie en T4 peut être la conséquence d'un régime alimentaire pauvre en iode ou d'une hypertension. L'hypothyroxynémie chez la femme enceinte est particulièrement grave car elle est associée à un retard de développement neurologique et intellectuel de l'enfant, corrélé à des altérations des neurones du cerveau. L'objectif du projet sera de caractériser les anomalies du réseau neuronal engendrées par une hypothyroxinémie au niveau du système nerveux entérique de l'intestin. Ce projet sera réalisé sur la progéniture de souris gestantes témoins et hypothyroxinémiques.

Tout en tenant compte du principe des 3R (limitation des effectifs ; raffinement des conditions d'hébergement en ajoutant des « frisottis » à la litière, des igloos ou des tunnels dans les cages leur permettant de jouer, de se cacher ; remplacement quand possible), l'étude proposée nous permettra d'étudier l'impact du traitement induisant l'hypothyroxynémie sur la motricité et la perméabilité intestinale. Dans ce projet, la motricité intestinale sera étudiée 1) en mesurant le temps de transit total (oro-anal) d'un marqueur (rouge carmin) ; 2) en évaluant le transit colique (fréquence d'émission des fèces, nombre ...). La perméabilité intestinale sera quant à elle évaluée in vivo en gavant les souris avec un marqueur fluorescent que l'on pourra ensuite détecter et mesurer dans le plasma. Cette étude s'effectuera 10, 30 et 55 jours après la naissance des souriceaux issus des souris gestantes traitées ou témoins. Ce projet nécessitera 24 souris gestantes maximum et nous estimons utiliser 6 à 8 souriceaux/souris gestante soit 144 à 192 souriceaux maximum.

8401 La reproduction est contrôlée par les neurones à gonadolibérine situés dans le système nerveux central. Ces neurones envoient des informations vers l'hypophyse qui va, à son tour, envoyer un message hormonal vers les gonades. En réponse à ces stimulations les gonades vont sécréter des hormones stéroïdiennes qui vont agir à différents niveaux et notamment sur le cerveau, sur des populations neuronales connues pour contrôler la reproduction. Ce sont ces interactions constantes entre les hormones stéroïdiennes et les neurones centraux qui vont permettre une adaptation fine de la reproduction, et permettre une réponse physiologique adaptés aux contraintes environnementales. La connaissance de ces mécanismes est une des clés majeures pour mieux maîtriser la reproduction dans les conditions physiopathologiques, chez les animaux et chez l'homme.

Les connaissances du mode d'action et de la cinétique d'action des stéroïdes sur le cerveau restent très parcellaire essentiellement dû aux limites des méthodes histologiques utilisées jusqu'à maintenant. Ces méthodes sont longues et nécessitent l'utilisation d'un grand nombre d'animaux et ne donnent des informations que sur un nombre restreint de structures.

Pour approfondir ces connaissances, nous étudions les interactions stéroïde-cerveaux en utilisant les outils d'imagerie in vivo qui permettent de suivre chez le même animal, l'impact des stéroïdes au cours du temps et sur l'ensemble du cerveau. Ces études sont réalisées chez la brebis qui constitue un modèle de choix, largement utilisé dans les études de neuroendocrinologie, et dont le cycle estriens est proche de celui de la femme.

Une première étude a été réalisée en 2016, mais elle doit être complétée par des données complémentaires qui sont apparues nécessaires après cette première étude.

Le projet a été réfléchi pour respecter la règle des 3R :

Remplacer : nous ne pouvons étudier ce mécanisme physiologique complexe sans recours à l'animal. Pour l'imagerie IRM, nous disposons d'un IRM clinique adapté aux animaux de grande taille qui permettra d'obtenir des résultats plus facilement comparables aux observations réalisées en clinique.

Réduire : L'utilisation de l'imagerie in vivo va permettre l'observation de nombreuses structures cérébrales en même temps, sur les mêmes brebis et au cours du temps. Cet outil, en plus d'être non

invasif, va donc permettre de réduire le nombre d'animaux utilisés. 10 brebis seront étudiées dans ce projet.

Raffiner : les animaux seront hébergés en groupes sociaux stables, sur paille et avec du foin de qualité à volonté. Les manipulations des animaux se feront dans le calme. Pour diminuer le stress et la douleur, la chirurgie et les acquisitions d'imagerie en IRM seront réalisées sous anesthésie générale, et après la chirurgie les brebis recevront, en plus, des traitements analgésiques à base d'anti-inflammatoires et d'anti-douleur.

8402 Au cours des 10 dernières années, de nombreuses études scientifiques ont montré que les micro-organismes peuplant l'intestin (bactéries, virus, parasites et champignons) ont une influence majeure sur la santé et sur le fonctionnement du cerveau. En effet, la composition de cette flore, nommée microbiote, intervient dans le contrôle de l'humeur, de la prise alimentaire, et également dans la cognition et la mémoire. De même, le microbiote est aussi impliqué dans le vieillissement et les maladies neurodégénératives telles qu'Alzheimer et Parkinson, pour lesquelles il n'existe à ce jour aucun traitement efficace. Ces découvertes ouvrent donc de nouvelles perspectives en proposant la modulation du microbiote comme nouvelle piste thérapeutique.

Ce projet vise donc à comprendre comment le microbiote intervient dans l'apparition et/ou l'évolution de ces maladies neurodégénératives afin de développer un nouveau modèle préclinique in-vivo (souris) permettant de tester de nouveaux composés médicamenteux. L'étude des interactions entre le microbiote intestinal et le cerveau ainsi que leurs effets sur la mémoire ne peut se faire que chez l'animal vivant, le remplacement par d'autres méthodes n'est pas possible. Les tests utilisés (reconnaissance d'objet, mémoire topographique et mémoire de travail) ne sont cependant pas ou peu aversifs et de très courte durée.

Pour ce projet, nous utiliserons des souris C57Bl/6J (lignée classiquement utilisée en neurobiologie) mâles et femelles. Nous réaliserons dans un premier temps des transferts adoptifs de microbiotes intestinaux issus d'autres souris C57Bl/6J ou 5XFAD (modèle transgénique de maladie d'Alzheimer) afin d'étudier les effets sur la mémoire (étude longitudinale). En parallèle, nous utiliserons des modèles de phases précoces de maladies d'Alzheimer et de Parkinson (souris C57Bl/6J) pour étudier leur microbiote et caractériser une éventuelle dysbiose. Ces phases précoces sont modélisées grâce à une injection intra-cérébrale unique de peptide beta-amyloïde (modèle Alzheimer) ou alpha-synucléine (modèle Parkinson), injection réalisée sous anesthésie générale et en conditions d'asepsie. Les animaux sont traités avec des anti-inflammatoires avant et après chirurgie afin de minimiser la douleur (raffinement) et sont placés au chaud et sous surveillance étroite jusqu'à récupération complète. Ainsi, après leur réveil suivant la chirurgie, ces animaux ne sont pas dissociables d'une souris normale n'ayant pas subi de chirurgie (raffinement), ce qui est nécessaire puisqu'une souris stressée ou souffrante ne pourrait effectuer de tests de mémoire. Dans le cas où une altération de l'état général de l'animal ou une inflammation serait observée, l'animal sera mis à mort immédiatement. Les déficits cognitifs de ces modèles précliniques étant d'ores et déjà caractérisés, cela nous permet de réduire d'une part le nombre de tests utilisés (raffinement) et d'autre part le nombre de souris nécessaires à l'étude (réduction).

Ce projet de 3 ans nécessite 1740 souris au total, chaque groupe étant composé de 12 souris. Ce nombre a été optimisé pour utiliser le moins d'animaux possible tout en permettant d'obtenir un effet statistique. Les animaux seront hébergés en cage collective jusqu'à la chirurgie, puis ils seront isolés une semaine pour permettre la cicatrisation, après quoi ils seront remis en cage collective en respectant les groupes de départ. Dans tous les cas, les cages contiendront du matériel de nidification ainsi que de l'enrichissement environnemental (raffinement), la durée d'isolement étant réduite au strict minimum.

8403 La cocaïne est la deuxième drogue illégale la plus consommée en Europe et son utilisation a augmenté au cours des 10 dernières années. Parmi les utilisateurs de cocaïne, tous ne développent pas une addiction ; seule une minorité vulnérable semble touchée (i.e., 15-20%). Ce qui frappe le plus dans l'addiction, c'est son apparente irrationalité. Les personnes affectées continuent de consommer la cocaïne, malgré un désir récurrent d'arrêter pour s'engager dans d'autres activités moins toxiques et plus acceptées socialement. Ce comportement paradoxal suggère que les mécanismes du cortex

préfrontal, notamment orbitofrontal, responsables de la prise de décision et des choix seraient altérés chez les individus vulnérables. Notre projet a pour but de tester cette hypothèse générale.

Ce projet est par essence mécanistique et nécessite une approche invasive qui n'est pas envisageable chez le sujet humain. Sa bonne réalisation repose donc sur le développement et l'utilisation d'un modèle animal - le rat de laboratoire – qui permet de reproduire de façon valide la distinction établie chez l'homme entre individus vulnérables et individus non-vulnérables face à l'addiction. Il s'agira de placer une population de rats face à un choix entre prendre de la cocaïne ou s'engager dans une activité alternative (i.e., boire une boisson édulcorée avec de la saccharine) et, ensuite, à sélectionner les individus vulnérables qui présentent une préférence marquée pour la prise de cocaïne. Le projet reposera également sur la mise au point d'une méthode optogénétique de manipulation *in vivo* de l'activité des neurones du cortex orbitofrontal (1 groupe ou lot de 40 rats) et de leurs projections sous-corticales principales pendant le choix (1 groupe ou lot de 40 rats pour 3 régions de projection ciblée, soit 120 animaux). Ces manipulations neuronales seront réalisées pendant le choix et devraient donc influencer, voire même changer, les préférences individuelles et, selon les cas, induire ou reverser la préférence pour la drogue chez les individus vulnérables. A terme, ce projet devrait contribuer à élucider le rôle des dysfonctions orbitofrontales dans la physiopathologie de l'addiction.

Notre projet nécessite au total l'utilisation de 160 rats mâles de souche Wistar sur une période de 3 ans. Ces animaux sont soumis à différentes procédures successives dont le degré maximal de gravité ne dépasse pas le degré « modéré ». Ces procédures sont de deux types : chirurgicale et comportementales. Toutes les procédures chirurgicales sont réalisées sous anesthésie, analgésie anti-inflammatoire et antibiotique dans des conditions aseptiques. De plus, pour prévenir toute infection, les animaux reçoivent pendant toute la durée de l'expérience un traitement antibiotique prophylactique. Les procédures comportementales sont toutes de degré de gravité « léger ». Elles consistent à offrir aux animaux le choix entre différentes sources de récompense dont la prise de cocaïne. Donc dans ce projet, toutes les expositions à la drogue ne sont pas forcées mais choisies par les animaux.

Il n'existe pas encore de modèles mathématique ou *in silico* permettant de remplacer l'utilisation du rat de laboratoire pour réaliser le projet proposé. L'addiction est un trouble du comportement qui ne peut pas être récapitulé sur des lignées cellulaires (humaine ou animale) ou tout autre modèle *in vitro* cellulaire ou subcellulaire. Toutefois, le nombre d'animaux nécessaire au projet est réduit au minimum. Ce nombre représente un compromis rationnel, compte tenu de l'exigence éthique de réduction du nombre d'animaux et des contraintes expérimentales propres au projet scientifique proposé. Notamment, ce nombre est nécessaire pour étudier de façon concluante les différences individuelles et/ou pour détecter des différences significatives robustes entre différents groupes expérimentaux. Tout au long des expériences, plusieurs critères sont pris en compte pour suivre régulièrement le niveau d'inconfort ou de souffrance des animaux et décider, le cas échéant, de procéder à l'arrêt de l'expérience si le point limite est atteint. Les animaux sont logés dans des cages collectives et enrichies afin de limiter l'ennui, le manque de stimulation, et ainsi promouvoir leur bien-être. A la fin des expériences, tous les animaux sont mis à mort de façon indolore et inconsciente, et ne sont donc pas réutilisés dans d'autres expériences.

8404 Les cancers des voies aérodigestives supérieures (VADS) regroupent un ensemble varié de tumeurs malignes dont l'un des traitements principaux est la radiothérapie. Si le but principal de ce traitement est de cibler et de détruire les cellules tumorales, l'un des effets secondaires présent est l'induction d'une réponse immune. Cette réponse peut être très bénéfique et améliorer l'effet de la radiothérapie en participant à la destruction tumorale mais elle peut aussi, dans certains cas, être responsable des phénomènes de radiorésistance ou de rechute. De nombreuses études ont déjà démontré que la combinaison de la radiothérapie avec des immunothérapies permet d'améliorer l'effet thérapeutique chez les patients. Cependant, la réponse immune anti-tumorale liée à l'efficacité et les mécanismes pro-tumoraux responsables de la rechute sont encore peu connus dans les cancers VADS. De même, peu de recherches ont été menées sur l'optimisation des doses et des cycles de thérapies combinées. C'est pourquoi nous avons développé un projet permettant d'étudier la combinaison thérapeutique

entre la radiothérapie et deux modulateurs de la réponse immune dans un modèle murin de cancers VADS.

Un des axes de l'étude consiste à optimiser les paramètres de la trithérapie comme les doses d'irradiation, les cycles de traitement avec les inhibiteurs et la durée des différents traitements. D'autre part, il nous est nécessaire d'analyser la réponse immunitaire mise en place pendant le traitement ainsi que son rôle dans l'efficacité de la trithérapie sur du long terme. Pour l'ensemble de ces axes d'étude, il est nécessaire de se placer dans un modèle vivant entier et dynamique dans lequel l'effet de la trithérapie et la réponse immunitaire pourront être analysés. En effet, la réponse immunitaire que nous souhaitons étudier ne se déroule pas uniquement au niveau du microenvironnement tumoral mais aussi dans le ganglion lymphatique drainant la tumeur. Les échanges entre ces deux sites se passent principalement par le réseau sanguin dans lequel circule un nombre important d'acteurs et de facteurs immunologiques. Ce système complexe n'a donc pas, jusqu'à aujourd'hui, pu être remplacé par des techniques alternatives.

Pour cette étude, nous avons mis en place des stratégies d'expérimentation et d'observation afin de réduire au minimum la souffrance et la douleur des animaux. Les souris seront hébergées en groupe pour minimiser le stress de l'isolement. Toutes les procédures expérimentales seront faites sous anesthésie. De plus, l'environnement des animaux sera enrichi en permanence par du coton ou des nids en carton afin de diminuer leur angoisse et favoriser leur bien-être. Les points limites seront strictement appliqués. Le nombre d'animaux sera adapté pour atteindre les objectifs du projet et réduire au minimum le nombre d'animaux. En effet, une analyse statistique a été effectuée afin de calculer le nombre d'animaux nécessaire pour détecter des différences significatives tout en réduisant au minimum le nombre d'animaux, qui a été estimé au maximum à 1696 souris. Cette approche pourra notamment améliorer les modalités de traitement de patients affectés du cancer, en minimisant les effets secondaires négatifs associés à la radiothérapie.

8405 L'ostéoradionécrose mandibulaire est la mort de l'os de la mandibule, causée par une radiothérapie. C'est un effet secondaire fréquent (10% des patients) qui apparaît un certain temps après traitement par radiothérapie pour un cancer de la cavité buccale ou de l'oropharynx. Le principal facteur de risque est l'extraction d'une dent dans l'année suivant la radiothérapie. Les symptômes sont principalement la douleur, le gonflement, une difficulté à ouvrir la bouche, l'infection.

Le traitement, souvent sur plusieurs années, associe des médicaments contre la douleur et l'infection (antibiotiques), parfois l'oxygénothérapie hyperbare.

Dans les cas de nécrose étendue, une séquestrectomie peut s'avérer nécessaire pour éliminer le fragment osseux nécrosé. Cela signifie que le tissu et l'os mort ou infecté qui entoure la plaie sera retiré.

Une chirurgie de reconstruction lourde est proposée dans les cas les plus évolués, par des greffes osseuses à l'aide d'os de la jambe et ne sont pas toujours possibles. Beaucoup de patients souffrant de cette pathologie ne peuvent plus s'alimenter par la bouche.

Bénéfices attendus :

Le projet développé entre une équipe de recherche spécialisée dans les biomatériaux et un service clinique de chirurgie du cancer est de créer une nouvelle substance osseuse de remplacement visant à être réimplantée dans la mâchoire après une chirurgie d'ostéoradionécrose mandibulaire étendue, sans avoir à réaliser de reconstruction. Ce biomatériau, aurait la capacité de s'intégrer dans l'os du patient mais également de traiter l'infection et d'empêcher la propagation de la nécrose.

La première étape a été d'élaborer cet os synthétique à l'aide de matériaux compatibles avec le vivant, et d'y inclure soit un, soit deux agents anti-microbiens. Ce biomatériau a été mis au point et finalisé en 2017 (études in vitro).

Nous devons maintenant démontrer la faisabilité de cette technique chez le rat, après avoir reproduit un modèle d'ostéoradionécrose mandibulaire animal, déjà décrit dans la littérature.

Espèces et nombres attendus :

34 rats seront utilisés. L'ostéoradionécrose est créée en réalisant une séance de radiothérapie focalisée sur la mandibule des rats, avec une extraction de 2 molaires à 3 semaines de la séance. 28

jours après l'extraction dentaire, une fois l'ostéoradionécrose authentifiée par scanner, le biomatériau sera greffé à la place de la nécrose mandibulaire des rats (24 rats) du groupe biomatériau, une séquestrectomie simple sera réalisée pour les rats du groupe contrôle (10 rats), puis les mandibules seront prélevées après euthanasie à trois et six mois et étudiées.

Effets adverses attendus :

Une douleur de la cavité buccale peut apparaître et sera traitée.

Des difficultés de prise d'alimentation par voie orale peuvent apparaître et seront prises en charge par utilisation d'une alimentation molle.

Application des 3R :

L'ensemble des règles garantissant le bien-être des animaux seront respectées.

Réduire : le nombre minimal d'animaux utilisé a été défini par des tests statistiques. Le modèle animal d'ostéoradionécrose mandibulaire est décrit dans la littérature.

Raffinement : Les rats seront manipulés plusieurs fois avant de débiter les expérimentations dans un souci d'habituation.

Toutes les procédures (radiothérapie, extractions dentaires, mise en place du biomatériau, scanner, euthanasie) seront réalisées sous anesthésie générale.

Un traitement antalgique sera mis en place dès le jour de la radiothérapie et cela jusqu'à la visualisation du remplacement total de l'os nécrosé par un os sain (scanner). L'alimentation sera molle.

Les rats seront hébergés à 2 par cage, leurs cages seront enrichies.

Remplacer : Les test in vitro ont été faits. Le test de ce biomatériau ne peut être réalisé in silico étant donné que l'objectif est de vérifier le remplacement de l'os et la biocompatibilité de celui-ci.

Enjeux en matière de cancérologie et de santé publique :

Cette étude est une première étape avant pouvoir utiliser cet os de remplacement et guérir les patients souffrants d'ostéoradionécrose mandibulaire. En cas de succès, il pourra être utilisé chez l'homme lors d'essais cliniques.

8406 Le but de ce projet est d'étudier l'effet anesthésique local d'un produit (anesthésique connu ou non) et de le comparer avec un produit anesthésique local de référence, puis de déterminer sa durée d'action et son mécanisme d'action chez le rongeur.

Dans la littérature, aucun modèle ne décrit l'effet d'un anesthésique local sur une muqueuse. Pour s'en rapprocher, le produit étudié sera administré localement dans le territoire du nerf sciatique ou dans la voûte plantaire d'une patte arrière chez le rongeur, selon les modèles les plus couramment utilisés pour caractériser un effet anesthésique local. En cas d'intolérance au produit (inflammation, rougeur, prurit, œdème,..), le traitement des autres animaux ne sera pas effectué.

L'administration d'un produit anesthésique permet de supprimer des sensations comme la douleur pour permettre la réalisation d'une intervention douloureuse qui ne serait pas réalisable sans ce produit.

L'effet anesthésique implique des processus physiologiques complexes via le système nerveux qui transmet les sensations au cerveau. Un modèle in vitro ou l'utilisation de cellules ne sont pas pertinents pour étudier l'ensemble de ces processus. Le protocole sur l'animal vivant est indispensable pour évaluer efficacement l'effet anesthésique local recherché des produits étudiés.

Le nombre d'animaux utilisé est le plus petit permettant de mettre en évidence un effet pharmacologique statistiquement significatif, c'est-à-dire de 12 animaux au maximum par dose étudiée. Le nombre de doses étudiées (comprenant le groupe témoin recevant le véhicule) est de 3 à 6 au plus par produit, et elles sont déterminées en fonction de résultats précédents ou de données de la littérature, pour réduire au minimum le nombre d'animaux utilisés, soit au plus 72 animaux par produit. Au maximum, 5 produits seront étudiés par an, soit 360 animaux au plus par an, dans 3

procédures différentes, soit 5400 animaux au plus pour la durée maximale du projet. Les animaux utilisés seront des souris (2700 au maximum) ou des rats (2700 au maximum).

Les animaux sont hébergés dans des conditions environnementales répondant à leurs besoins, avec un enrichissement adapté, un suivi quotidien de leur bien-être et l'application des points limites pour réduire la douleur, la souffrance et l'angoisse.

8407 Le b-NGF (beta-Nerve Growth Factor) est un facteur de croissance connu pour son action sur le système nerveux et il serait aussi impliqué dans l'induction de l'ovulation chez des espèces à ovulation spontanée (mouton et souris). Nous voulons tester cette hypothèse dans un protocole d'induction de l'ovulation chez la souris pré pubère qui n'a pas d'ovulations spontanées. A terme, l'utilisation de ce facteur pour induire l'ovulation pourra s'appliquer à des espèces d'élevage comme le mouton afin d'éviter les problèmes de désensibilisation aux traitements hormonaux.

Le protocole proposé s'inscrit dans la règle des 3 R :

Réduire : nous avons choisi la taille des groupes sur la base de la fréquence observée des souris qui ovulent sans induction (lot témoin négatif) en tenant compte de l'intervalle de confiance que nous souhaitons et de la marge d'erreur acceptable. Ainsi 10 animaux par groupe sont requis. Cinq groupes, soit 50 souris, seront étudiés (un groupe témoin négatif, un groupe témoin positif, un groupe recevant une dose faible de b-NGF, un groupe recevant une dose moyenne de b-NGF et un groupe recevant une dose forte de b-NGF).

Raffiner : les souris seront hébergées par quatre et le milieu sera enrichi par la présence d'igloos en carton (boîtes à œufs).

Remplacer : nous avons réalisé au préalable des études in vitro qui nous ont permis de déterminer les trois doses à tester.

8408 Avec pour cause principale les accidents sur la voie publique, le traumatisme médullaire est un problème de santé publique concernant 2,5 millions de personnes dans le monde (il s'agit dans 70% des cas d'une population jeune (32 ans en moyenne) essentiellement masculine), dont 50000 en France avec une incidence de 1000 nouveaux cas par an. Le taux de mortalité après un traumatisme médullaire varie de 2–3.1% chez les patients jeunes, et de 25–38.6% chez les patients âgés. Les contraintes mécaniques subies par le tissu médullaire lors de l'impact ont pour effet de tuer localement les neurones ou d'endommager les axones. De plus, une cascade complexe d'évènements cellulaires incluant la formation d'œdème cérébral, l'excitotoxicité, l'apoptose et l'inflammation va venir aggraver les dommages neuronaux et axonaux. Ces dommages neuronaux conduisent à une perte partielle ou complète des fonctions motrices et sensorielles ainsi que des réflexes médullaires, et se manifestent chez le patient par une paraplégie (44% des cas) ou une tétraplégie (56% des cas) en fonction du niveau médullaire touché. De plus, au moins 16% des patients présentent de sévères troubles de l'attention, de la mémoire ou du langage. Il n'existe à ce jour aucune thérapie curative.

Ce projet vise à : (1) étudier dans quelle mesure un traumatisme médullaire affecte durablement l'organisation, le fonctionnement et la plasticité des réseaux de neurones situés à distance du choc traumatique, (2) évaluer l'effet d'une stratégie thérapeutique moléculaire, associée ou non à une thérapie de réhabilitation physique, sur les modifications physiopathologiques survenant localement et à distance du site de lésion dans le but de favoriser la récupération fonctionnelle (motrice et cognitive) dans un modèle de traumatisme médullaire chez la souris. Pour ce faire, notre protocole expérimental a été établi de la manière suivante : (1) maîtrise technique du modèle animal choisi par du personnel compétent en terme de chirurgie, (2) caractérisation du modèle animal en termes de volume de lésion, d'atteintes cérébrales secondaires, et de déficits moteurs et cognitifs, (3) effet thérapeutique de notre molécule candidate associée ou non à une réhabilitation physique. L'efficacité de cette stratégie thérapeutique sera étudiée en termes de volume de lésion (histologie), de neuroinflammation (immunohistochimie), de neurodégénérescence (immunohistochimie), de plasticité (études des fibres par IRM du tenseur de diffusion ex vivo, immunohistochimie et dosage de monoamines), de marqueurs plasmatiques sanguins et de récupération motrice (Basso mouse scale, open-field, étude du patron de marche et cinématique de la locomotion) et cognitive (labyrinthe en T et reconnaissance du nouvel objet) après un traumatisme médullaire par compression chez la souris.

Le projet requiert l'utilisation de 204 souris C57BL/6J sur une durée de 2 ans et respecte les exigences de Remplacement, Réduction et Raffinement en matière d'expérimentation animale :

- Remplacement : Le projet s'appuie sur un modèle de traumatisme médullaire chez la souris pertinent par rapport à la situation chez l'homme. Il n'existe pas à ce jour de méthodes substitutives à l'expérimentation animale permettant de reproduire la complexité des phénomènes physiopathologiques faisant suite à un traumatisme médullaire.

- Réduction : Notre stratégie expérimentale a été conçue minutieusement afin de réduire le nombre d'animaux sans compromettre le bon déroulement du projet : (1) suivi comportemental au cours du temps (différents tests), (2) seuls les groupes contrôles-opérés strictement nécessaires pour répondre aux questions scientifiques posées seront établis, (3) tous les tissus (cerveaux, moelle épinières) et les plasmas sanguins collectés dans le cadre de ce projet seront conservés dans une banque de tissu afin d'anticiper des analyses complémentaires relatives au dit projet et/ou des analyses pour des projets apparentés, (4) le nombre d'animaux a été réduit au minimum nécessaire nous permettant l'utilisation de tests statistiques adaptés sans compromettre les résultats.

- Raffinement : Le laboratoire est doté de l'ensemble des infrastructures (animalerie, salles d'expérimentation etc) nécessaires à l'exécution de ce projet et dispose des agréments requis et délivrés par la préfecture. Les conditions d'hébergement et d'enrichissement du milieu dans lequel les animaux évoluent respectent les directives européennes. Les méthodologies mises en œuvres sont respectueuses du bien-être des animaux et réalisées par du personnel technique / de recherche formé et qualifié. De plus, la vétérinaire de l'établissement nous fera part dès que besoin de ses recommandations en terme de raffinement tout au long de ce projet. Nous serons entre autres particulièrement vigilants pour l'évaluation et la prise en charge de la douleur. Concernant l'évaluation de la douleur, des points limites généraux et spécifiques en adéquation avec les besoins expérimentaux ont été déterminés afin d'éviter toute souffrance ou détresse des animaux. La prise en charge de la douleur sera assurée par l'utilisation d'un analgésique et un anti-inflammatoire non stéroïdien. De plus, des mesures prophylactiques en accord avec la pratique d'interventions chirurgicales seront également incluses afin de prévenir toutes complications infectieuses. Enfin, des critères d'arrêt ont été établis en cas d'automutilation ou de persistance de signes douloureux, d'infection, d'une perte de poids continue et/ou d'une déshydratation marquée, malgré les mesures prévues à cet effet.

8409 Les plaquettes sanguines jouent un rôle fondamental dans les processus d'hémostase. C'est ce qui nous permet d'éviter les hémorragies en cas de blessures ou de lésions. Quand le taux de plaquettes circulantes chute en dessous de 10.000 plaquettes par μL de sang chez un patient, le risque d'hémorragie interne devient important et une transfusion peut être envisagée. Une complication post transfusionnelle connue est la production d'anticorps anti-plaquettes par le receveur dirigés contre les plaquettes du donneur, on parle alors d'allo-immunisation. Ainsi, si le receveur développe de tels anticorps de nouvelles transfusions seront inefficaces sur un plan thérapeutique puisque les plaquettes du donneur seront détruites par ces anticorps. Cette problématique est particulièrement importante chez des patients dont les pathologies nécessitent des transfusions plaquettaires récurrentes.

Dans la majorité des cas, les allo-anticorps produits sont dirigés contre des molécules exprimées à la surface des plaquettes, plus particulièrement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMH I), un ensemble de molécules propres à chaque individu.

Caractériser la cible des anticorps anti-plaquettes produits permettrait de mieux comprendre les processus immuns liés à la transfusion chez l'homme.

Nous étudierons donc l'expression des molécules du CMH I à la surface des plaquettes sanguines puisqu'elles sont responsables de la production d'anticorps dans la majorité des cas d'allo-immunisation. L'expression de ces molécules sera étudiée au cours du vieillissement des plaquettes dans la circulation sanguine d'une part, et dans un modèle de souris mimant une thrombopathie plaquettaire d'autre part.

Réduire : Tous les tests pour mettre au point la détection des molécules de CMHI par différentes techniques seront réalisés sur un même prélèvement. Les conditions expérimentales déterminées

ainsi seront utilisées pour toutes les autres expériences. De plus, le nombre d'animaux utilisés lors des expériences sera minimalisé, avec la contrainte d'obtenir des données statistiquement significatives.

Remplacer : Les études visant à caractériser l'expression des molécules de classe I dans les plaquettes sanguines circulantes ne peut se faire que grâce à des modèles *in vivo*. Cette étude ne peut pas être remplacée par des tests *in vitro*.

Raffiner : Les conditions d'environnement sont optimisées par l'enrichissement des cages avec du coton et de la frisure pour permettre aux souris de construire des nids comme dans la nature, ce qui leur permet de compartimenter leur environnement selon leurs besoins. Elles ont un accès permanent à l'eau de boisson et à la nourriture. Une fiche de suivi sera mise en place pour suivre l'état des animaux et veiller à leur bien être tout au long de l'expérimentation.

Ce projet nécessitera 58 souris.

8410 La maîtrise de la reproduction des animaux d'élevage repose principalement sur la stimulation de l'ovulation par des hormones. Des systèmes considérés plus « naturels », tel l'effet mâle, sont aussi utilisés mais leur efficacité est moindre. Pour différentes raisons, ces deux approches ne répondent pas de façon satisfaisante aux attentes sociétales (absence de contaminant dans les produits consommés et de pollution de l'environnement) et à celles des producteurs (efficacité et rentabilité). Nous avons, dans un projet précédent, développé des analogues à partir d'un neurotransmetteur endogène, la kisspeptine (Kp) comme piste originale pour réduire voire éliminer l'utilisation d'hormones. Ce neurotransmetteur joue un rôle clé dans la stimulation de la reproduction, mais son instabilité métabolique, et par conséquent sa durée d'action trop courte, empêche son utilisation sur le terrain. Nous avons donc conçu et synthétisé des analogues avec une durée d'action plus importante que la molécule naturelle. D'une façon remarquable, ces analogues induisent chez la brebis et chez la chèvre une augmentation prolongée du niveau plasmatique des gonadotrophines, hormones indispensables pour induire l'ovulation chez les mammifères. Ces effets sont obtenus avec des doses très faibles d'analogue et en utilisant une voie d'injection intramusculaire, compatible avec une utilisation dans les élevages. Par ailleurs, ces molécules se sont avérées être très bien tolérées et dépourvues d'effets secondaires, raisons qui nous ont permis de déposer un brevet. Les résultats obtenus ont été très positifs avec l'identification de molécules capables, après prétraitement avec un progestagène (dérivé synthétique de la progestérone), de synchroniser et d'induire des ovulations fertiles chez la brebis et chez la chèvre. Nous souhaitons aujourd'hui nous affranchir du prétraitement avec le progestagène, afin d'éliminer les risques liés à l'utilisation d'hormones stéroïdiennes. L'objectif est d'arriver à stimuler progressivement le système pour qu'un cycle complet puisse avoir lieu, c'est-à-dire une croissance folliculaire suivie d'une ovulation d'un follicule mature, et la formation d'un corps jaune fonctionnel. Pour ce faire nous avons besoin de connaître, entre autre, la durée d'action de notre molécule et son éventuelle faculté à désensibiliser le récepteur à la kisspeptine pour pouvoir développer une stratégie adéquate d'activation du système. Nous testerons également cette molécule chez le mâle en vue de stimuler le comportement sexuel chez les béliers pendant la période d'inactivité sexuelle. L'ensemble de ce projet vise donc à développer des outils simples d'utilisation, garantissant une sécurité sanitaire, et efficaces afin de maîtriser la reproduction chez les petits ruminants.

Pour réaliser notre projet, nous allons appliquer le principe des 3R pour réduire, raffiner et remplacer l'utilisation des animaux. A présent il n'est pas possible de remplacer l'utilisation d'animaux par des études *in vitro* pour l'analyse d'un phénomène aussi complexe et intégré que l'ovulation ou encore l'étude du comportement sexuel. Donc la seule solution possible est l'expérimentation sur animaux vivants. Néanmoins pour réduire le nombre d'animaux utilisés nous allons utiliser les mêmes animaux au cours de plusieurs expériences sans que cela ait un impact sur leur bien-être. Cela constitue le meilleur compromis possible entre la nécessité d'obtenir des résultats fiables et celui de réduire le nombre d'animaux. Le nombre total d'animaux utilisés sera de 95 ainsi réparti 53 brebis, 24 bélier et 18 chèvres. Enfin, nous raffinerons chaque expérimentation dans le but de réduire au maximum l'inconfort, la douleur ou l'angoisse subie par les animaux. Les méthodologies utilisées dans le cadre de ce projet ne dépasseront pas une douleur de classe modérée et nous mettrons en œuvre tout notre possible afin de garantir le bien-être de l'animal en lui apportant les soins adéquats en fonction

des besoins. Les brebis seront anesthésiées par une induction au thiopenthal sodique (Nesdonal, 1g/80kg) ou par injection intraveineuse de xylazine 0.05mg/kg et de kétamine 20mg/kg et maintenues par anesthésie gazeuse (Vetflurane 3%). Une anesthésie locale est réalisée avec de la lidocaïne au site d'incision (environ 5 ml de Lurocaïne). Les traitements post opératoires consistent en une injection intramusculaire de Terramycine LA (1ml/10kgs ; antibiotique = oxytétracycline) et une injection intramusculaire d'anti inflammatoire non stéroïdien Finadyne 2ml/50 kgs (flunixin méglumine) éventuellement renouvelée 48H après si signes douloureux (baisse d'appétit, prostration, décubitus prolongé.). Les brebis seront placées par groupe de 2 à 4 dans des cases de 8m2 dans les locaux de la plate-forme durant une semaine et surveillées quotidiennement. Après cette période, les animaux réintégreront leur hébergement d'élevage (bergerie semi-ouverte où ils sont maintenus en groupes)

8411 Les infections bactériennes sévères représentent un problème croissant de santé publique. Le sepsis est caractérisé par une intense réaction inflammatoire suivie d'une phase d'immunodépression soutenue. Le choc septique en constitue la présentation la plus grave qui demeure grevé d'une mortalité importante en particulier dans des populations vulnérables comme les patients porteurs de cancer. Grâce aux progrès de la réanimation, la plupart des patients survivent à la phase initiale mais présentent ainsi une susceptibilité particulière aux infections nosocomiales. Ces anomalies immunitaires acquises sont également susceptibles d'influencer l'évolution de maladies chroniques sous-jacentes comme les maladies cardio-vasculaires ou le cancer. En pratique clinique, l'impact de ces infections sévères sur le pronostic du cancer est difficile à établir, justifiant une modélisation expérimentale pertinente chez l'animal.

Ce projet de recherche vise à étudier les relations réciproques qui existent entre cancer et réponse septique induite par les infections bactériennes graves ainsi que les mécanismes qui contrôlent ces phénomènes. Les conséquences immunologiques induites par le choc septique ainsi que les réponses immunes anti-tumorales sont complexes, et ne peuvent être que très insuffisamment explorées chez l'homme. La complexité de la réponse immunitaire des mammifères ne peut être reproduite par des méthodes alternatives in vitro ou ex vivo, et nécessite d'avoir recours à des modèles animaux. Pour cela, nous souhaitons établir un modèle pertinent de choc septique appliqué chez des souris cancéreuses, et ainsi mimer une situation clinique communément rencontrée en réanimation. Pour cela, les souris seront d'abord inoculées par des cellules tumorales malignes par voie sous-cutanée (modèle de tumeur localisée) ou par voie intraveineuse (modèle de dissémination métastatique). A différents stades de développement tumoral, les animaux seront ensuite soumis à une péritonite polymicrobienne (ligature et ponction caecale) ou une intervention contrôle (laparotomie simple). Nous utiliserons différentes lignées de souris sauvages et génétiquement modifiées pour étudier les mécanismes impliqués dans la modulation des réponses immunes au cours du sepsis. Le nombre de souris utilisées sera de 1600 sur une période de 5 ans.

Pour respecter le principe des 3R, le nombre d'animaux utilisé sera réduit au minimum. Cela nécessite de contrôler au maximum la variabilité inhérente à ce type d'expérimentation en homogénéisant strictement les conditions expérimentales. Afin de limiter au maximum la souffrance et l'anxiété infligée aux animaux, les procédures chirurgicales seront réalisées sous anesthésie générale et un traitement antalgique sera systématiquement administré aux animaux au décours de la procédure chirurgicale. Les inoculations tumorales par ponction rétro-orbitaire seront réalisées sous une brève anesthésie générale. Nous avons raffiné la méthodologie par l'introduction de points-limites qui ont été validés avec la structure locale chargée du bien-être animal, entraînant la mise à mort anticipée de l'animal si nécessaire.

Les mécanismes de réponse du système immunitaire rapportés au cours du cancer et des infections graves présentent de troublantes similitudes. Il est important de mieux comprendre de quelle manière l'organisme est capable de détecter et de combattre les tumeurs malignes. A l'heure du développement spectaculaire des thérapies d'immunothérapie anti-cancéreuse, les résultats obtenus dans ce travail contribueront certainement à une meilleure compréhension des relations complexes et réciproques qui existent entre cancer, infections bactériennes et inflammation aiguë.

8412 Le but de ce projet est de développer des approches thérapeutiques pionnières pour restaurer la vision chez les patients atteints d'une dégénérescence des cellules ganglionnaires, l'une des causes

majeures de cécité dans les pays occidentaux (glaucome, rétinopathie diabétique, occlusions des veines/artères rétiniennes centrales, neuropathies optiques, tumeurs ou lésions traumatiques).

Les cellules ganglionnaires de la rétine sont des neurones qui reçoivent les informations visuelles des photorécepteurs de l'œil et qui les transmettent au cerveau via leurs axones qui forment le nerf optique.

En effet, si certaines maladies causant la cécité prennent leur origine au niveau de la rétine, d'autres résultent de la rupture de communication entre la rétine et le cortex cérébral et il n'existe à ce jour aucun traitement à ces atteintes du nerf optique.

Ainsi ce projet vise à restaurer la perception visuelle en réintroduisant de l'information visuelle directement dans les zones des centres visuels supérieurs du cerveau, le thalamus et le cortex visuel primaire.

Les approches thérapeutiques testées ici se basent sur l'optogénétique. Cette technique permet de rendre des neurones sensibles à la lumière en combinant le génie génétique et l'optique. Elle permet en particulier de stimuler spécifiquement un type cellulaire en laissant les cellules voisines intactes.

Règle des 3 R : 1) Remplacement. Des résultats prometteurs de ces approches ont été obtenus sur le modèle murin et in vitro sur des structures visuelles humaines. Il reste néanmoins nécessaire de valider l'efficacité de ces techniques in vivo sur des modèles pertinents. Le modèle primate reste essentiel à ce jour pour avancer sur ces questions en ophtalmologie du fait de l'homologie avec l'Homme de ces structures visuelles (fovéa, type de vision trichromatique), structures dont les autres mammifères sont dépourvus. 2) Réduction. Le nombre d'animaux est réduit au maximum tout en permettant d'obtenir les réponses scientifiques escomptées, les effectifs sont basés sur le nombre de vecteurs viraux à tester, plusieurs vecteurs peuvent être testés chez un même sujet. 3) Raffinement. Afin de limiter les contraintes pour les animaux, toutes les expériences seront réalisées sous anesthésie générale et les animaux recevront un antalgique. Les animaux seront hébergés en groupes sociaux dans un environnement enrichi et seront soumis à un programme d'entraînement à coopérer basé sur la distribution de récompenses.

Pour ce projet, 84 singes seront utilisés sur 5 ans pour, (i) identifier des vecteurs ayant une transduction efficace dans les cellules neurales d'intérêt, (ii) mesurer l'activité des neurones via des outils d'optogénétique.

Cette nouvelle demande est un avenant à une autorisation de projet déjà soumise et acceptée. Cet avenant n'a pour objectif que d'ajouter une procédure pour le prélèvement des organes d'intérêt (procédure sans réveil).

8413 Les produits biologiques d'origine animale (PBOA) sont des produits utilisés par la communauté scientifique en recherche, en médecine, comme outils de diagnostic, etc. Ce projet, initié et validé par une direction scientifique, a pour objectif de mettre à disposition de la communauté scientifique ou de l'industrie, des produits biologiques provenant de différentes espèces animales (aviaires, bovines, ovines, caprines, porcines, équines, camélidés, lagomorphes...). Différents produits biologiques (sang, fèces, urine, lait, colostrum, œufs, mucus) pourront être recueillis. Les animaux seront prélevés sporadiquement ou de façon répétée afin de fournir les PBOA demandés, indispensables à l'avancée de plusieurs travaux. En fin d'utilisation, les animaux seront soit euthanasiés soit gardés en vie.

Le nombre d'animaux utilisés correspond à la juste quantité nécessaire pour répondre aux besoins en y intégrant les recommandations éthiques et les temps de récupération le cas échéant. Ainsi, au vu des demandes 150 poules, 30 dindes, 30 canards, 10 lapins, 30 bovins, 30 ovins, 30 caprins, 25 porcins, 5 équins et 5 lamas seront utilisés sur 5 ans.

Afin de permettre aux animaux de s'adapter à leur environnement et de s'assurer de leur bon état de santé, une période d'acclimatation sera dispensée avant prélèvement. Tout au long de leur maintien sur le site, les animaux seront hébergés avec des congénères et/ou avec d'autres espèces compatibles, dans un environnement enrichi. Ils disposeront de conditions d'hébergement adaptées et optimales (logement, environnement, alimentation, apport en eau, soins). Afin de les maintenir, elles seront vérifiées quotidiennement. Dans le but de repérer rapidement toute anomalie, les animaux seront suivis quotidiennement. Ainsi, si un animal montre des signes de pathologie, de souffrance ou

de douleur, le vétérinaire (ou tout autre personne compétente) interviendra pour mettre en place un traitement thérapeutique et/ou des soins divers dans le but de le soigner ou de le soulager.

8414 Dans le cadre de l'enseignement de la licence pro BEMOVA (Biologie analytique et expérimentale des micro-organismes du végétal et de l'animal) les étudiants de la filière animale ont un module obligatoire, le niveau 2 d'expérimentation animale. et les travaux pratiques sur animaux vivants font partie intégrante de la formation légale.

Dans un premier temps les animaux sont manipulés sans qu'il ne soit effectué de gestes techniques pour que les étudiants apprennent à gérer leur propre stress et rassurer l'animal en habituant celui-ci à main de l'homme.

Puis nous apprenons aux étudiants à réaliser les deux gestes qui nécessitent que l'animal soit vigile. Le gavage pour conserver le réflexe de déglutition.

L'injection en intra péritonéale pour anesthésier les animaux

Le reste des gestes techniques que nous enseignons (pesée, marquage, injection intraveineuse, intramusculaire, prélèvements etc.... se fera sur des animaux anesthésiés le dernier geste sur animaux vivant est l'injection intracardiaque pour euthanasier les animaux par un sur dosage de Thiopental

Les animaux euthanasiés nous servent ensuite pour effectuer des travaux pratiques d'anatomie

La licence BAEMOVA parcours animal s'adresse à 30 étudiants par ans et ceux-ci bénéficient de 4 TP en comptant l'examen final il nous faudra donc 120 rats et autant de souris par année scolaire. Ce qui représente un total de 1200 animaux pour les cinq prochaines années scolaires.

La règle des 3 R est enseignée aux étudiants lors des cours qui leurs sont dispensés pour l'obtention du niveau 2 en expérimentation animale et leur est constamment rappelée aux cours des travaux pratiques.

8415 Dans la nature, de nombreux insectes participent au recyclage des nutriments en digérant les bio-déchets. Ils les transforment en matières utiles aux plantes, et eux-mêmes deviennent des aliments de choix pour les autres animaux. L'entomoculture (élevage d'insectes) rétablit ce lien en apportant une réponse économique et écologique aux besoins de production de protéines et de gestion des matières alimentaires non consommées. L'utilisation des larves de Black Soldier Fly, offre aux producteurs de bio-déchets (industrie agroalimentaire, restauration, grandes surfaces...) une solution de valorisation compétitive de leurs matières en les transformant en fertilisants.

La consommation de ses larves par des animaux d'élevage est autorisée par la réglementation, uniquement si les larves sont vivantes. Cela suppose qu'on ne peut pas les distribuer assainies aux animaux. Dans nos conditions de production, certains lots d'élevage de larves ont subi une mortalité importante. Des études préliminaires montrent que cette mortalité est probablement due à un agent pathogène de ces larves encore non identifié.

L'objet de l'étude est donc double :

- 1°) Evaluer l'effet des larves sur la santé des poulets (par rapport à une alimentation 100% végétale)
- 2°) Evaluer l'impact de l'ingestion de larves contaminées (cause de mortalité chez la larve) sur la santé des poulets

Dans cette première étude, un maximum de 45 poulets (3x 15) de chair sera alimenté soit avec un aliment classique seul, ou supplémenté avec des larves saines et comparé à un lot supplémenté de larves « contaminées ».

Remplacement : l'objectif de l'étude est d'évaluer l'innocuité de larves infectées ou non sur des poulets de chair en croissance. Pour répondre à cette question il est donc nécessaire d'utiliser l'animal cible.

Réduction : L'objectif de cette étude est de mesurer sur un effectif réduit un effet important de la contamination des larves sur le poulet. Dans le cas où un effet mineur ou aucun effet ne serait observé des études complémentaires sur des lots d'animaux plus important pourront être envisagées.

Raffinement : La distribution de larves constitue en soit un enrichissement des conditions de vie des animaux. Il n'est a priori pas attendu de stress ou de douleur liés aux procédures expérimentales. Si des animaux devaient présenter un état de souffrance avéré, les dispositions prévues dans le point limite seraient appliquées.

8416 Notre projet vise à étudier le rôle d'une protéine donnée au cours du stress métabolique au sens large. Basé sur des résultats préliminaires au laboratoire, nous pensons que notre protéine d'intérêt pourrait avoir un rôle prépondérant dans trois types cellulaires au cours du stress métabolique, l'adipocyte, le macrophage et l'hépatocyte. Basé sur le système CRE-LOX, nous utiliserons des modèles génétiques ou nous ferons une délétion spécifiquement notre protéine cible dans chacun de ces types cellulaires. Nous bloquerons aussi son action par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique (les inflachromènes) sur des souris type sauvage C57Bl/6J. Ces souris représentent donc l'unique modèle pour étudier de manière intégrée le rôle de notre protéine d'intérêt dans la progression du stress métabolique associé à l'obésité (principe de remplacement). Un très large panel de challenges nutritionnels sera appliqué régime hyperlipidique (60% ou 45%), régime hyperlipidique déficient en choline, régime cétogénique, mise à jeun, mise à jeun puis renourris. Au cours de ces challenges, nous évaluerons la prise de poids, de masse grasse et l'altération de l'homéostasie glucidique de manière non invasive (echoMRI, test de tolérance au glucose, pesée etc.). Compte tenu de la variabilité des paramètres biologiques généralement observée au sein d'un groupe homogène et de la durée des protocoles, des groupes de 10 animaux seront formés afin de pouvoir mettre en évidence des différences statistiques (principe de réduction). L'étude nécessitera au total 1900 animaux. Les souris devenant obèses après quelques semaines de régime gras, seront hébergées par cage de 3 individus. Les souris soumises à d'autres types de régime n'entraînant pas d'obésité pourront être hébergées par cage de 5 individus. Les lignées type sauvage et transgéniques de souris utilisées dans cette étude, sont toutes sur fond génétique C57Bl/6J, classiquement utilisées dans les études du métabolisme, dont les males répondent très bien au régime gras notamment. Les procédures seront réalisées dans le respect du bien-être animal, sous anesthésie lorsque nécessaire pour limiter la souffrance, la douleur ou l'angoisse des animaux, et en respectant des points limites préalablement définis (principe de raffinement).

8417 Une tumeur du sein constitue l'apparition d'une grosseur palpable au niveau du sein qui provient du développement anormal du tissu mammaire. Le cancer du sein est donc une tumeur maligne de la glande mammaire. Autrement dit, c'est un cancer qui naît dans les cellules dont la fonction est de sécréter le lait. Il apparaît essentiellement chez la femme, avec 89 cas pour 100 000 (le cancer du sein survient 200 fois moins souvent chez l'homme, qui possède lui aussi des seins, bien qu'atrophiés). 500 000 femmes meurent chaque année de ce cancer dans le monde selon l'OMS.

5 à 10 % de ces cancers ont une origine génétique héréditaire ; 85 à 90% des cas (forme dite sporadique ou non-héréditaire) ont des origines environnementales mal comprises. Une proportion importante des cancers du sein sporadiques est induite par des traitements hormonaux chez les femmes présentant une prédisposition à ce type de cancer. Certains choix de mode de vie (alcool, régime gras, obésité, manque d'exercice physique) ou gynécologiques (première grossesse tardive, absence d'allaitement, etc.) favorisent aussi ce cancer.

L'objectif de ce projet est d'étudier l'efficacité curative d'un composé immunostimulant, composé ayant montré une efficacité anti-tumorale préventive significative sur le développement de tumeurs mammaires induites chez le rat femelle. La femelle est privilégiée compte-tenu de la prévalence du développement de ces cancers chez la femme. Le traitement effectué et proposé est curatif afin de pouvoir proposer des solutions de traitement ou de combinaison de traitement. Les 2 précédents projets ont permis de montrer que le composé testé stimulait le système immunitaire et qu'il permettait ainsi de retarder l'apparition des tumeurs mammaires, leur nombre, leur taille et leur degré de malignité en agissant directement sur les cellules tumorales. Le but de ce nouveau projet est d'évaluer les effets de ce composé, administré seul ou en combinaison avec un traitement de chimiothérapie de référence sur l'efficacité anti-tumorale et sur la protection d'effets secondaires liés au traitement de chimiothérapie. Des animaux induits et non induits seront mis à mort à des temps réguliers afin d'effectuer des dosages de marqueurs circulants au niveau du sang, de différents organes (foie, rate, reins, ovaires, cornes utérines et vagin) et surtout au niveau des tumeurs mammaires développées

pour étudier l'expression de gènes (petite portion de patrimoine génétique) impliqués dans le développement tumoral et la prolifération des cellules tumorales et dans l'expression de récepteurs aux hormones, le développement du cancer du sein étant dépendant du taux d'hormones ou hormono-dépendant, en comparaison avec le tissu mammaire sain. Une analyse histologique des tumeurs mammaires sera également effectuée pour mettre en parallèle l'expression de ces gènes et récepteurs par rapport à leur degré de malignité.

Cent vingt (120) rats femelles seront répartis en 5 groupes de traitements (un groupe sans induction de tumeur servant de contrôle et 4 groupes avec induction de tumeurs). Les tumeurs mammaires sont induites 24 heures avant le début des traitements par une administration orale unique d'un composé chimique ciblant le tissu mammaire (procédure 1). Les traitements sont effectués quotidiennement pendant 6 mois par une injection intrapéritonéale (reproduisant une injection dans le ventre pour la femme) avec un placebo ou le produit immunostimulant, et par une administration orale avec un placebo ou le Tamoxifène (traitement de chimiothérapie de référence) voire par la combinaison produit immunostimulant-Tamoxifène (procédure 2). Un suivi du développement des tumeurs est effectué chaque semaine et des prélèvements de sang sont effectués régulièrement pour vérifier les paramètres sanguins et également des marqueurs immunitaires (procédure 3). Le poids des animaux est mesuré 2 fois par semaine et un suivi des prises alimentaire et hydrique est effectué également 2 fois par semaine tout au long de l'expérimentation. La mise à mort des animaux est effectuée par injection d'une surdose d'anesthésique à 3 temps après l'induction des tumeurs mammaires : 2, 4 et 6 mois, avec 8 animaux par groupe pour chaque temps de mise à mort.

Les animaux seront placés à deux par cage (48 x 27 x 20 cm) pendant toute la durée de l'étude, sans enrichissement comme pour les 2 précédentes études pour ne pas influencer sur l'induction des tumeurs mammaires et sur les paramètres mesurés au cours de l'étude (l'enrichissement pouvant modifier la production de marqueurs circulants, la physiologie générale des animaux et donc le développement des tumeurs mammaires). Des points limites concernant une perte de poids de 20% du poids maximum atteint ou de 15% cumulés sur 3 jours consécutifs, une souffrance (cachexie, affaiblissement, hypothermie persistante), difficulté à bouger ou à manger, diarrhée pendant au moins 48h, taille des tumeurs importante ou des tumeurs interférant avec la locomotion des animaux, seront suivis et toute atteinte de l'un de ces points limites entrainera la mise à mort des animaux en conformité avec les recommandations éthiques (Raffinement). Les résultats des études précédemment réalisées sur ce modèle d'induction de tumeurs mammaires (ne pouvant être effectuées sur des modèles *in vitro*) (Remplacement), ont permis de démontrer que le nombre d'animaux prévu par groupe et par temps de prélèvement pour cette étude, 8 rats, permettra d'obtenir des résultats significatifs (Réduction).

Cette étude présente un enjeu socio-économique certain compte-tenu de l'incidence des cancers du sein chez la femme dans le monde. Le composé testé chez le rongeur pourrait ensuite être testé chez l'Homme, ouvrant ainsi la voie à des traitements moins coûteux et surtout avec peu ou pas d'effets secondaires associés.

8418 Les cryobanques nationales permettent depuis déjà 35 ans, la conservation de semences animales d'intérêt. C'est le cas de la cryobanque porcine qui conserve notamment des paillettes de semences de verrats des races locales.

La semence a été congelée dès le début des années 1980, alors que les techniques étaient alors très basiques; des petits trous étaient réalisés dans des blocs de glace à l'aide de matériels chauffants puis la semence mélangée avec des extraits d'œufs et de lait était étalée sur ces plaques. Les billes produites ont été conservées dans l'azote liquide jusqu'à aujourd'hui. A la décongélation, nous observons peu de spermatozoïdes mais suffisamment pour réaliser des inséminations et obtenir des mise-bas.

Ces inséminations sont particulièrement importantes pour la sauvegarde des races locales porcines, en voie de disparition. En effet, il est nécessaire de recréer une hétérogénéité pour les porcs blancs de l'ouest, les bayeux, les culs noir du limousin, les gascons et autres basques.

L'utilisation de paillettes issues de « familles éteintes » permet avec les mises-bas de recréer instantanément une variabilité génétique pour ces races à faibles effectifs. Il s'agit d'un enjeu fort pour la sauvegarde de ces populations très réduites.

Les performances de reproduction obtenues avec ces semences, après des inséminations dans l'utérus sont encore trop faibles. Des industriels ont développé des sondes d'insémination dites profondes, il s'agit en réalité de remonter le cathéter (1m87) de dépôt de la semence le plus haut possible dans les cornes utérines, afin de déposer la semence le plus près possible des ovaires et ainsi maximiser les chances de fécondation. Ces sondes ont jusqu'alors été utilisées pour réaliser des transferts embryonnaires mais pas des inséminations profondes.

Dans ce projet, nous souhaitons tester la faisabilité sur 12 cochettes, 6 seront inséminées avec un volume de semence standard 100ml et 4 milliards de spermatozoïdes et 6 avec un volume faible de 20 ml et 1 Milliard de spermatozoïdes.

Les objectifs étant :

1 d'obtenir plus de mises-bas et de porcelets

2 de diminuer l'utilisation des rares stocks de la Cryobanque nationale

La règle des 3 R est prise en compte :

Remplacer : pour faire naître des porcelets l'utilisation animale est obligatoire

Réduire : nous avons réduit le nombre de femelles par lot à 6 afin de limiter le recours animal mais maintenir une puissance statistique

Raffiner : les inséminations sont réalisées au cours des chaleurs. Pendant l'œstrus, les femelles sont immobiles, nous profitons de cet état pour remonter doucement le cathéter par les voies naturelles. Notre expérience est grande avec ce dispositif (plusieurs dizaines de transferts embryonnaires réalisés), nous n'avons jamais observé de réaction de la femelle. Le cas échéant, nous stopperions l'insémination.

Par ailleurs les femelles sont élevées en liberté sur d'épaisses litières de paille, permettant un comportement de fouissage tel que recommandé par l'EFSA.

8419 De nombreux arguments suggèrent qu'une atteinte des synapses, structures de communication entre les neurones, est au cœur des maladies neurodégénératives. Par exemple au cours de la maladie d'Alzheimer, il existe un dysfonctionnement des récepteurs synaptiques au glutamate de type NMDA, substrats de la mémoire. Il paraît essentiel de déchiffrer les mécanismes qui aboutissent à ces dysfonctionnements, corrélés aux troubles de mémoire des patients, car leur connaissance pourrait ouvrir des perspectives thérapeutiques. Il existe une maladie neurologique, l'encéphalite à anticorps anti-récepteur NMDA, au cours de laquelle les malades produisent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur NMDA de leurs propres neurones et présentent des troubles de mémoire aigus. Les auto-anticorps de ces patients perturbent la synapse de façon aiguë. Notre objectif est d'utiliser expérimentalement chez la souris ces auto-anticorps de patients souffrant d'une encéphalite pour étudier les mécanismes de blocage des récepteurs NMDA. Ce modèle expérimental permettra d'étudier les conséquences de ce blocage à la fois sur le fonctionnement synaptique des neurones et sur la structure de leurs synapses.

A ce stade, un modèle murin a été développé permettant de délivrer les anticorps anti-récepteur NMDA des patients aux souris. La communauté scientifique a déjà avancé la compréhension du mode d'action de ces anticorps et a constaté que les effets biologiques sont longs à se mettre en place (plus de 14 jours) et qu'il y a une progression longue de l'action des anticorps. L'effet de ces anticorps sur la mémoire et l'apprentissage a été évalué par des tests comportementaux et les conséquences d'une exposition de ces anticorps sur la physiologie des cellules nerveuses est également étudié. Pour poursuivre ces études, il est nécessaire de connaître quel est l'impact de ces anticorps à un temps d'exposition prolongé sur la mémoire et dans quelle mesure ces effets s'atténuent dès que l'exposition à ces anticorps s'arrête.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R. Nous veillerons à limiter le mal être des animaux en enrichissant leur environnement et en leur fournissant des analgésiques adaptés lors des

soins post opératoires (Raffinement). Nous limiterons le nombre d'animaux (n=145) au maximum en réalisant les expérimentations de comportement et d'analyse tissulaire sur les animaux d'un même lot (Réduire). Pour évaluer l'impact des anticorps sur la mémoire, il est nécessaire d'avoir recours à des animaux. En effet cette étude va nous permettre d'évaluer l'impact des auto-anticorps anti-récepteur NMDA dans un modèle complexe, proche de la pathologie humaine et il sera possible d'étudier les effets comportementaux associés à ces changements morphologiques et moléculaires (Remplacement). L'ensemble de ces expériences permettra de mieux comprendre les mécanismes cellulaires des encéphalites auto-immunes et d'une façon plus générale les mécanismes physiopathologiques impliquant les récepteurs NMDA

8420 Malgré son rôle fondamental dans le développement des jeunes mammifères, y compris chez l'Homme, le processus de lactation (production de lait), et notamment son impact sur l'organisme maternel est encore incomplètement étudié. Le but de ce projet est d'étudier de quelle manière le calcium stocké dans l'organisme de la femelle se mobilise lors de la lactation. La méthodologie mise en œuvre dans ce projet repose sur le suivi de la répartition des isotopes du calcium dans l'organisme maternel, avant, pendant et après la lactation. En effet, le calcium est un élément chimique qui peut avoir plusieurs masses, chaque calcium de masse différente étant appelée isotope. Il est possible de suivre ces proportions d'isotopes par une analyse de sang. La lactation affectant ces proportions des différents isotopes du calcium, son effet sur le calcium organique pourra donc être suivi par des analyses sanguines. Cette méthodologie permettra de répondre à une variété de questions en biologie (mobilisation du calcium) et en paléontologie (origine de la lactation chez les mammifères notamment). Ce projet sera réalisé sur l'espèce porcine dans des conditions d'élevage contrôlées et pour lesquelles nous disposons de données et de connaissances sur les truies depuis plusieurs décennies.

Un suivi dans le temps des différents isotopes du calcium sera réalisé grâce à des prélèvements de sang, recueillis à différentes étapes d'un cycle de reproduction de 5 truies, de leur gestation jusqu'au sevrage des porcelets. Au total 7 prélèvements de sang espacés de plusieurs semaines (3 pendant la gestation, 1 consécutive à la mise bas, 3 après la mise bas) et de faible volume (4 ml de sang) seront réalisés sur chaque truie.

Un prélèvement de sang est aussi prévu sur 10 animaux témoins (5 verrats et 5 jeunes truies) afin de récolter des données sur des individus non concernés par la lactation. Un effectif de 5 individus est le minimum nécessaire pour assurer la représentativité statistique des résultats. Le nombre total d'animaux soumis aux prises de sang est de 15.

Nous avons pris en compte la règle des 3R,

Remplacer : afin de mesurer l'évolution des isotopes au cours du cycle de reproduction des femelles, l'utilisation d'animaux est nécessaire.

Réduire : nous avons réduit l'effectif des individus suivis au maximum possible pour conserver une représentativité statistique. Notre projet sera réalisé dans le cadre d'un projet tiers n'impliquant que les porcelets issus des truies de ce présent projet. Les prélèvements chez les mâles seront réalisés lors des prises de sang sanitaires réglementaires, un tube supplémentaire sera seulement collecté lors des prises de sang planifiées.

Raffiner : le projet tiers impose des conditions d'hébergement enrichies pour les mères des porcelets. Les prélèvements sanguins sont séparés d'au moins 2 semaines. Ils seront réalisés par des personnes formées pour ce type de prélèvements et qui ont grande habitude de les réaliser en respectant le bien-être animal.

8421 Le syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS) est un problème de santé publique majeur associé à des pathologies graves tel que le sepsis, les chocs (hémorragiques, septiques, cardiogéniques, etc.), brûlures et les traumatismes. Le SIRS est extrêmement fréquent et peut aboutir à des conséquences dramatiques avec des défaillances multi viscérales responsable d'une mortalité élevée, d'une prise en charge lourde et de coup de santé publique important. Le SIRS caractérise par une « tempête de cytokines », caractérisée par une expression et une régulation anormale de diverses cytokines, notamment pro-inflammatoires. La manifestation du SIRS chez l'adulte inclut au

moins 2 des critères suivants : une altération de la respiration, une dérégulation de la température, une tachycardie et un état hyper ou hypo-inflammatoire. De façon générale, un patient est considéré en état de SIRS lorsqu'il présente deux critères ou plus.

En clinique les systèmes de circulation extracorporelle (CEC), consistant à dériver hors du corps le sang pour le filtrer ou faciliter l'accès à un organe ou compléter sa fonction (poumons en oxygénant le sang par exemple), sont de plus en plus utilisés pour les chirurgies cardiaques tels que les pontages coronariens ou les remplacements ou plasties valvulaires ou dans l'attente de greffes chez des patients insuffisants cardiaques. Elles sont donc indispensables lors d'interventions ou au lit du patient mais génèrent un SIRS important à grave (dans 80% des CEC). Les réponses intégrées à ce syndrome sont actuellement difficilement maîtrisables et aboutissent dans 40% des cas à des conséquences néfastes tel que la dysfonction multi-viscérale.

Il devient donc urgent de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Une société a mis au point des traitements visant les réponses aux stress tels qu'on peut les retrouver lors d'un SIRS associés à une CEC. L'avancée de leurs travaux et du développement des molécules nécessite, avant l'arrivée en clinique, le test sur les modèles animaux représentatif de la réalité, de la CEC. Notre projet vise à évaluer, grâce à nos modèles animaux, le potentiel thérapeutique des molécules proposées sur la réponse au stress. Le but de ces études est de valider un traitement permettant passer en phase d'essai clinique chez les patients.

Dans cette étude l'établissement d'un modèle de SIRS par la mise en place d'une CEC chez le rat doit passer par une étape de mise au point de la technique et la validation du modèle qui sera l'objectif de la première phase de l'étude. L'approche sera confirmée par des chirurgiens et des anesthésistes réanimateurs afin d'être le plus juste possible. Ce modèle est appuyé par de nombreuses publications, assurant sa faisabilité et attestant sa reproductibilité. Pour la mise au point efficace de ce modèle plusieurs étapes et points clés sont mis en place.

Une fois mis en place ce modèle servira au test des molécules sur la réponse au stress intégrée sur ce modèle et l'évaluation de son potentiel thérapeutique, notamment sur les fonctions cardiaque, vasculaire, rénale et inflammatoire, fonctions particulièrement touchées par le SIRS.

Ce modèle n'est ici pas Remplaçable au vu de la complexité des réponses et de leurs intégrations ainsi que de l'interactions avec et entre les différents organes. Les expérimentations sont prévues pour Réduire au maximum le nombre d'animaux utilisés tout en ayant des données statistiques assez puissantes qui ne nécessiteront pas l'utilisation de nouveaux animaux, notamment grâce à l'étape de mise au point. Afin d'optimiser au maximum notre étude, nous apporterons un soin particulier à Raffiner nos techniques lors de la mise au point afin de limiter le nombre d'animaux par une meilleure reproductibilité et diminuer la mortalité dans la suite des études. Afin de prévenir les souffrances et de ne pas altérer les résultats de l'étude, une médication adaptée sera administrée et des points limites seront définis, au-delà desquels les animaux seront retirés de l'étude (signes de souffrances importants par exemple).

Plusieurs investigations seront réalisées sur les mêmes animaux, afin de limiter la multiplication de groupes expérimentaux. Les groupes seront alors constitués du nombre nécessaire d'animaux, déterminés lors de la mise au point du modèle afin d'obtenir des résultats statistiquement exploitables, le but étant de limiter au maximum le nombre d'animaux utilisés mais de garder une puissance statistique suffisante pour pouvoir conclure sur nos résultats. Au total, le projet devrait intégrer 405 rats Wistar.

8422 Le lupus systémique érythémateux (LES) est une maladie auto-immune caractérisée par une inflammation chronique aboutissant à la dégradation de certains organes (les reins, la rate). Notre projet innovant a pour but d'étudier l'efficacité anti-inflammatoire de 4 molécules contre cette pathologie. L'amélioration des signes cliniques dans une souche murine développant de manière spontanée un lupus (MRL/MpJ Fas lpr), permettra à court terme de valider l'effet thérapeutique des molécules de manière préclinique et de déterminer la toxicologie de nos agents thérapeutiques; pour à plus long terme, valider leur utilisation chez des patients lupiques. Les expérimentations animales ne peuvent pas être remplacées par des expérimentations in vitro. L'efficacité anti-inflammatoire des molécules nécessite une première validation chez des souris lupiques avant de pouvoir être vérifiée chez l'homme. La stratégie utilisée sera réalisée en trois phases, dans un premier temps observer les

premiers signes cliniques du lupus, dans un second temps déterminer la toxicologie des molécules, et dans un dernier temps tester l'efficacité des molécules afin d'observer une réduction ou une diminution des symptômes. Les animaux sont produits à cet effet dans une structure agréée qui tient compte de l'éthique animale et assure l'élevage et le suivi quotidien des animaux dans les meilleures conditions de bien-être conformément à la législation et la règle des 3R. De notre côté nous nous attachons à bien définir le projet et sa pertinence comme le stipule la règle des 3R. En effet avant, de réaliser les procédures des études préliminaires ont été réalisées afin de remplacer chaque fois que cela est possible le modèle in vivo par des modèles in vitro. A ce stade du projet, l'utilisation de modèles animaux reste inévitable puisqu'aucun modèle suffisamment précis n'est disponible pour étudier cette pathologie et sa réponse aux traitements. L'efficacité d'un nouveau traitement passe nécessairement par ces études in vivo et l'intérêt d'avoir un modèle mimant cette pathologie permet de mieux appréhender l'efficacité de nouvelles molécules et ce dans le même environnement. Le nombre d'animaux a été réduit au strict minimum nécessaire pour être statistiquement significatif et scientifiquement irréprochable. Au total 340 souris seront nécessaires pour réaliser cette étude. Afin de raffiner les conditions de vie des souris, un suivi adapté des animaux a été instauré afin de réduire, supprimer ou soulager l'inconfort, mais aussi la détresse ou l'angoisse qu'ils pourraient éprouver. Les animaux sont hébergés en groupes sociaux et bénéficient d'un enrichissement adapté.

8423 Les malformations congénitales cardiovasculaires et cranio-faciales sont souvent associées; ce sont des causes majeures de mortalité infantile qui affectent 2% des naissances. Toutefois, les événements génétiques, développementaux et cliniques responsables de ces malformations sont encore largement méconnus ce qui rend anticipation et traitement impossible en l'état des connaissances. Les avancées récentes en biologie du développement montrent que le cœur et les muscles de la tête et du cou proviennent de mêmes cellules progénitrices embryonnaires. Nous étudions le contrôle génétique de ces cellules qui sont soumises à des événements complexes et contribuent à la formation du cœur et des muscles dérivés. Nos objectifs sont d'identifier les processus moléculaires et cellulaires impliqués dans leur développement afin de mieux appréhender les malformations congénitales, pour exemple le syndrome du DiGeorge dont le gène majeur est Tbx1. Nos recherches sont réalisées chez la souris dont le développement cardiovasculaire et des muscles antérieurs est semblable à celui de l'homme dans sa complexité.

Nous étudions les étapes précoces, lorsque les cellules se multiplient et font le choix de participer au cœur ou aux muscles de la face et du cou. Nous nous intéresserons également aux étapes fœtales lorsque les défauts de développement précoces susceptibles d'impacter les fonctions vitales avec altération des muscles précités sont visibles. L'objectif est toujours d'identifier le lien qui existe entre l'origine des cellules cardiaques et celles des muscles du cou et de la face, d'incrémenter ainsi nos connaissances quant à l'étiologie des pathologies congénitales qui affectent ces tissus et envisager à long terme le traitement de ces pathologies chez l'homme.

Les événements qui nous intéressent dans ce projet sont propres à l'organisme entier et vivant; dès lors que cela est possible nous effectuons nos recherches sur des cellules en culture. Toutefois, nous nous intéressons à des étapes du développement et l'existence de nombreux facteurs produits par les tissus à proximité ne permet pas de réaliser les recherches présentées avec des cultures de cellules. Dans cette étude, les animaux génétiquement modifiés (transgéniques et knockouts) représentent des atouts pertinents. Ce sont des modèles de cardiopathies et myopathies craniofaciales congénitales (souris mutantes) dont nous pouvons identifier l'origine embryonnaire de façon ciblée. Notre plan expérimental a été réalisé afin de réduire le nombre d'animaux en expérimentation. Tout au long de l'expérimentation nous nous attacherons à reconnaître la douleur, la quantifier via une échelle, agir lorsque les critères d'interruption prédéfinis sont atteints, noter dans le registre des animaux les observations faites et les actions entreprises. Nous nous attacherons à éviter la souffrance des animaux en expérimentation qui se traduirait de toute façon à l'obtention de résultats erronés. Ce projet nécessite l'utilisation de 1050 souris, 60 animaux type sauvage et 990 génétiquement modifiées. Les actes invasifs seront réalisés sous anesthésie profonde.

Les souris utilisées dans ce projet sont élevées en groupes sociaux, dans des environnements complexes pour leur permettre de se comporter normalement ; en présence d'objets permettant le raffinement de l'environnement. Les élevages sont effectués au sein de notre établissement agréé et

5 personnes sont dédiées à l'organisation et l'entretien des élevages ; tous les jours l'état sanitaire et le bien-être (BEA) des animaux sont contrôlés.

Tous les arguments ont été réunis et étudiés pour permettre la faisabilité de notre projet.

8424 Le glioblastome multiforme (GBM) est la principale tumeur primaire du système nerveux central. Il se caractérise par sa très forte agressivité associée à une importante capacité invasive des cellules cancéreuses. Malgré les traitements combinant la radiothérapie et la chirurgie, le GBM a un très mauvais pronostic (médiane de survie d'environ 14 mois). Nous nous intéressons en particulier à un type de tumeur représentant 10-20% des GBMs dont les cellules allongent leurs extrémités chromosomiques par un mécanisme spécifique (Alternative Lengthening of Telomeres : ALT).

Ce projet a pour objectif de développer des stratégies de traitement des GBMs basées sur l'administration de nouvelles molécules. Celles-ci se sont déjà montrées efficaces *in vitro* pour réduire la prolifération des cellules tumorales. Nous étudierons en particulier certaines molécules ciblant le mécanisme ALT qui permettraient de lutter contre les tumeurs soit en provoquant la mort des cellules tumorales et/ou en bloquant leur progression dans le cycle cellulaire.

Le nombre d'animaux nécessaires par groupe de traitement (10) a été ramené au minimum pour assurer la validité des résultats. Un total de 960 rongeurs provenant d'un élevage reconnu sera nécessaire à cette étude qui se déroulera sur une période de 5 ans.

Le protocole requiert un modèle préclinique chez l'animal car aucune méthode alternative (modèle cellulaire ou simulation informatique) n'existe à ce jour pour modéliser l'effet *in vivo* des traitements de molécules actives sur des gliomes en association, ou pas, avec la radiothérapie.

Trois différentes lignées de GBMs humains, dont une tumeur ALT, seront implantées après anesthésie et analgésie, par stéréotaxie (une technique pour atteindre des zones du cerveau de manière précise grâce à un système de coordonnées dans l'espace), dans une zone déterminée du cerveau (le striatum) afin de reproduire une diversité tumorale.

Environ un mois après l'injection, les différentes molécules d'intérêt seront administrées de trois à cinq fois par semaine pendant deux semaines.

Un suivi de la progression tumorale sera réalisé régulièrement par bioluminescence sur les animaux vivants anesthésiés. Les rongeurs destinés aux études d'histopathologie tumorales seront euthanasiés après anesthésie profonde à différents moments après traitements.

Parallèlement, des études de survie (méthode de Kaplan-Meier) seront effectuées afin de valider l'effet des molécules d'intérêt sur la survie des rongeurs. Dans cette procédure, les critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus. Toutes les procédures mises en œuvre dans ce projet comprennent l'utilisation d'analgésiques avant, pendant et après les xénotransplantations. Une observation clinique journalière et l'application de critères d'arrêt permettent de veiller au bien-être des animaux.

8425 Le virus respiratoire syncytial (VRS) et le virus Influenza sont les principaux pathogènes responsables d'infections respiratoires graves, et d'épidémies hivernales conduisant à de nombreuses hospitalisations et un taux important de décès. Le VRS infecte la quasi-totalité des enfants avant leurs deux ans, dont un tiers développe une bronchiolite pouvant conduire à une hospitalisation. Ce virus provoque également des maladies graves chez les personnes âgées et immunodéprimées. Si toutes les personnes adultes ont déjà été en contact avec le VRS et sont régulièrement réinfectées, l'immunité mémoire contre le virus est inefficace à long terme. Malheureusement, il n'existe aucun vaccin pour protéger contre cette infection. Seul un traitement préventif consistant en l'injection d'un anticorps monoclonal est actuellement disponible, mais son coût élevé (3000-5000 €) en limite l'utilisation aux enfants prématurés. L'infection par le virus Influenza entraîne quant à elle de fortes fièvres accompagnées de céphalées et douleurs musculaires. L'importante variabilité du virus nécessite la mise au point de vaccins annuels adaptés aux souches virales circulantes. Toutefois, ces vaccins peuvent s'avérer inefficaces suite à l'apparition de nouvelles souches virales. Dans un tel contexte, la recherche de nouvelles stratégies vaccinales ainsi que de traitements antiviraux contre ces deux virus constitue un enjeu de santé publique.

Le présent projet a pour première ambition d'élaborer des vaccins inertes, reposant sur l'injection de protéines isolées du VRS ou du virus influenza comme vecteurs vaccinaux. Cette stratégie vise à induire une réponse immunitaire efficace contre ces virus en stimulant la production d'anticorps neutralisants spécifiques. Il est indispensable d'évaluer nos vaccins à l'aide de modèles animaux, car la réponse immunitaire repose sur un ensemble de cellules de notre organisme, et leur capacité à circuler entre les différents organes lymphoïdes et les tissus touchés par l'infection (ici le poumon).

Le second objectif de ce projet consiste à tester l'effet antiviral de molécules (peptides, nanoparticules, petites molécules, anticorps) dont l'efficacité et l'innocuité auront été préalablement validés *in vitro* sur cellules eucaryotes. L'efficacité des molécules en tant que traitement préventif ou curatif sera testée. Tester l'effet de ces molécules *in vivo* est indispensable afin d'évaluer la biodisponibilité et l'innocuité des traitements à l'échelle de l'organisme entier.

Ce projet durera 5 ans et comprendra des expérimentations sur souris Balb/c. Cette lignée de souris est en effet sensible au VRS et au virus Influenza, et constitue un bon modèle pour étudier la vaccination et le traitement par des antiviraux contre ces virus. Les essais de vaccination visent à déterminer la capacité de nos protéines à induire la production d'anticorps neutralisants et à tester l'efficacité de l'immunisation contre le VRS ou l'Influenza. Concernant les expérimentations en présence d'antiviraux, différentes stratégies antivirales ont actuellement déjà montré un effet inhibiteur contre le VRS chez la souris. A ce titre, un minimum de 10 molécules à tester est prévu. Le nombre d'animaux dans une expérience répondant à des besoins statistiques pour prouver l'efficacité du vaccin et à la nécessité d'inclure des groupes expérimentaux témoins non vaccinés/non traités, nous estimons que ces expériences, devant se dérouler sur 5 ans, nécessiteront 332 souris par an, soit un total de 1660. Tout au long de ces expériences, les animaux seront élevés en groupe sociaux dans des cages (6 animaux maximum dans une cage), et du papier absorbant sera ajouté pour enrichir le milieu. Toute manipulation (injection/prélèvement) sera systématiquement réalisée sous anesthésie. Nos virus ont été modifiés de façon à exprimer la protéine permettant de suivre de manière peu invasive la réplication virale dans l'animal vivant, à l'aide d'une caméra d'imagerie fonctionnelle IVIS. Ces virus permettent de suivre l'infection au cours du temps (2 à 5 jours post-infection) par mesure de la luminescence au niveau du poumon et des voies respiratoires supérieures, limitant ainsi le nombre d'animaux impliqués dans une expérimentation. Enfin, un suivi quotidien des souris traitées et infectées sera réalisé. En cas d'apparition de signes cliniques significatifs (souris prostrée et incapable de se nourrir et/ou ayant perdu 20 % de son poids initial), l'animal sera euthanasié.

8426 La rectocolite hémorragique (RCH) est une maladie inflammatoire chronique de l'intestin dont les retentissements cliniques sont invalidants. La RCH est associée à un déficit d'expression au niveau du colon d'une protéine ayant des vertus anti-inflammatoires, régulant à l'état normal nos défenses naturelles, le récepteur activé par les proliférateurs de péroxysomes γ (PPAR γ). En effet, ce récepteur est fortement exprimé dans la muqueuse colique normale et il a une puissante activité anti-inflammatoire *in vitro* et *in vivo*. Nos précédents travaux réalisés sur des cellules coliques en culture ont montré qu'il existe un lien étroit entre la diminution des taux d'oxygène dans le milieu de culture et l'expression de PPAR γ . Nous avons également montré que le sildenafil, un composé connu pour sa capacité à dilater les vaisseaux sanguins, induit une augmentation et une restauration de l'expression de PPAR γ dans des cellules coliques cultivées à des taux très bas d'oxygène. Du fait de ses propriétés vasodilatatrices, le sildenafil a été utilisé avec succès dans le traitement des troubles de la fonction érectile et de l'hypertension artérielle pulmonaire. L'intérêt du sildenafil n'est cependant pas limité à son action vasculaire car il aurait d'autres propriétés notamment anti-inflammatoires. Nous proposons de déterminer si le sildenafil, seul ou en association avec une molécule qui mime les effets de PPAR γ -l'acide 5-aminosalicylique (5-ASA)-, pourrait constituer une solution thérapeutique dans le cadre de la RCH légère à modérée.

Pour tester cette hypothèse, nous voulons au préalable évaluer son effet sur un modèle murin de colite. Pour la réalisation de cette colite, l'administration de Dextran Sodium Sulfate (DSS) aux souris sera effectuée. En parallèle à la réalisation de cette colite les différents médicaments seuls ou en association seront administrés à ces souris. Au total, 50 souris seront nécessaires pour mener à bien cette expérimentation. Notre protocole répond aux impératifs des 3R.

Remplacement : Des études in vitro ont été menées pour étudier les mécanismes d'action avant d'envisager cette étude préclinique.

Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au minimum tout en permettant une analyse statistique et scientifique.

Raffinement : Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée et par groupe de cinq. L'environnement sera enrichi et l'alimentation sera contrôlée. Les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique et de leur comportement. Si les points limites fixés étaient atteints, les souris seraient euthanasiées. En effet, l'utilisation d'agents thérapeutiques anti-inflammatoires ou analgésiques n'est pas envisageable dans ce type d'approches fonctionnelles, visant à étudier l'inflammation.

8427 La toxoplasmose est une maladie parasitaire causée par le parasite *Toxoplasma gondii*.

L'Homme ne meurt pas de l'infection toxoplasmique et la phase chronique de la maladie se caractérise par la présence de kystes principalement cérébraux. Contrairement à la souris, le rat reproduit la physiopathologie humaine.

En fonction des souches de rats, la susceptibilité à la maladie varie puisque certaines sont totalement réfractaires à l'infection et ne développent pas de chronicité. Il a également été montré in vitro dans des macrophages péritonéaux que cette résistance était reliée à une voie de l'inflammasome qui est activée par le parasite lors de l'infection.

Le but de l'étude est de valider in vivo cette voie. Pour cela, il est prévu de tester un inhibiteur de cette voie chez des rats sensibles ou résistants et de regarder si cela change le phénotype observé chez les animaux non traités. Il s'agit ainsi de démontrer l'importance de cette voie dans la résistance à la maladie.

La règle des 3R est respectée. Au cours de ce projet, 30 rats seront manipulés, nous avons prévu des groupes avec un nombre minimum d'animaux. Les animaux seront observés régulièrement au cours des expériences afin de surveiller les points limites (perte de poids, changement de comportement, apparence physique) impliquant si nécessaire l'arrêt des expérimentations. Nous avons limité le nombre d'animaux en testant plusieurs inhibiteurs de la voie Nlrp1 in vitro et avons validé l'importance de l'un d'entre eux. La validation in vivo de l'effet de cet inhibiteur sur l'issue de l'infection toxoplasmique nécessite de regarder la modulation de celle-ci chez les animaux.

8428 Etude de l'efficacité du graphène dans le traitement du glioblastome

Les glioblastomes sont des tumeurs cérébrales d'origine astrocytaire de très mauvais pronostic avec une survie médiane des patients à 15 mois après diagnostic. Le traitement actuel repose, lorsque cela est possible, sur une exérèse chirurgicale suivie de traitements de radio et/ou chimiothérapie. En dépit de nombreux efforts de recherche ces dernières décennies, force est de constater que la stratégie thérapeutique est en échec. Les derniers espoirs en rapports avec l'utilisation de thérapies ciblées se sont révélés négatifs qu'il s'agisse des anti-angiogéniques ou plus récemment des approches d'immunothérapie. Un des verrous majeurs de cet échec est l'invasion tumorale qui survient au niveau des 2-3cm des berges opératoires où les drogues ne pénètrent pas. Une nouvelle voie thérapeutique à ce niveau est de modifier la quiescence cellulaire et bloquer l'invasion. La stimulation électrique extra cérébrale vient d'apparaître et montre une augmentation de la survie des patients de 4 mois.

Le graphène est un matériau unique très résistant, capable de conduire le courant de transférer les gènes et de modifier par interaction directe le microenvironnement tumoral. Sa biocompatibilité et une expérience pilote a montré la faisabilité d'une injection intracérébrale sans toxicité histologique ni comportementale. Le projet vise à vérifier la survie sur un modèle murin d'un traitement par le graphène, couplé à des siRNA ou à une stimulation électrique.

L'utilisation de 150 souris doit permettre d'obtenir un résultat statistiquement significatif pour vérifier l'efficacité du graphène contre le glioblastome, en traitement seul, couplé à des siRNA ou par application d'une stimulation électrique.

Toutes les précautions sont prises pour éviter la souffrance des animaux au cours de l'expérimentation.

En effet la règle des 3 R sera appliquée en diminuant au maximum le nombre d'animaux, en surveillant tous les jours leur état comportemental, et en les pesant. Une fois que les points limites précis définis dans le projet seront atteints, nous déclencherons immédiatement l'euthanasie.

Ces expériences sont menées dans le cadre d'un projet européen.

8429 Dans le cadre d'un enseignement d'immunologie de niveau master (deuxième cycle d'universitaire), nous étudions la formation dans la rate de structures appelées centres germinatifs, qui n'apparaissent que suite à une immunisation. Pour l'étude de la formation de ces centres germinatifs, aucune méthode non-animale ne peut être utilisée.

Ce projet qui respecte la règle des 3R requiert l'utilisation d'animaux pour la production de ces organisations cellulaires très particulières dans la rate. 16 souris seront utilisées par an (80 au total pour la durée du projet), dans une seule procédure de sévérité légère comportant uniquement une immunisation. Aucun impact délétère n'est attendu pour les animaux. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum (une souris par binôme d'étudiants) et la contrainte pour les animaux est minime.

8430 La prise en charge médicale des patients souffrant de cancer nécessite le recours à différents traitements thérapeutiques injectés visant à tuer les cellules cancéreuses présentes dans l'organisme des patients.

La réglementation impose, avant toute administration chez l'Homme, de disposer d'un rationnel scientifique solide et de preuves de concept d'efficacité in vitro mais aussi in vivo. Il est donc requis, avant tout essai clinique, d'apporter la preuve que le traitement expérimental atteint bien la cible visée et qu'il déclenche la mort des cellules cancéreuses ciblées.

La démonstration du bon ciblage du traitement expérimental se fait en premier lieu sur les mêmes lignées cellulaires que celles ayant servies pour les études préalables in vitro mais dans un contexte in vivo, reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des médicaments potentiels ainsi que l'impact du système immunitaire.

Pour cela, nous nous basons sur des lignées cellulaires tumorales injectées sur souris. Ces lignées cellulaires sont disponibles sur commande auprès de fournisseurs agréés, ce qui permet d'avoir accès à la quasi-totalité des lignées cellulaires utilisées par la communauté scientifique mondiale. Si les lignées cellulaires sont moins proches des tumeurs humaines que les xénogreffes de tumeurs, leur diversité et leur disponibilité sur commande, permet de sélectionner, pour chaque traitement, la ou les lignées permettant de l'évaluer de façon pertinente. Elle permet également de pouvoir évaluer un traitement expérimental in vivo sur la ou les mêmes lignées cellulaires que celles utilisées pour les preuves de concept in vitro.

L'objectif de ce projet est donc de confirmer in vivo les propriétés anti tumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) ayant présenté une activité in vitro. Il est également d'identifier les traitements présentant un intérêt thérapeutique fort in vivo mais aussi de définir les paramètres nécessaires au choix de leur posologie en vue de leur utilisation future en développement préclinique aval, notamment sur modèles de PDX, puis en clinique.

Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un traitement mais ce travail sur organisme entier ne peut être remplacé.

Les évaluations in vivo seront réduites aux seuls traitements ayant démontré préalablement une efficacité anti tumorale in vitro. Réduisant ainsi les essais aux seuls traitements ayant un potentiel d'utilisation clinique fort. Ainsi sur 10000 traitements qui vont entrer en essai in vitro, moins de 250 seront évalués in vivo.

Afin de raffiner les études et garantir la qualité des résultats, l'ensemble des études se déroulent dans des conditions d'hygiène rigoureuses, permettant d'assurer un statut sanitaire optimal et prévenir des problèmes de santé. Dans chaque cage, les animaux recevront un enrichissement de milieu (« Neslets ») il est également prévu un ajout d'enrichissement supplémentaire (bâtons de bois, « Dome house ») en cas de bagarre et une supplémentation de l'alimentation en gel nutritif en cas de perte de poids.

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 50 études visant à évaluer 50 traitements innovants sur lignées cellulaires. Les études comprendront chacune 60 animaux au maximum, soit un total de 3000 animaux au maximum.

8431 Chaque nouveau traitement thérapeutique arrivant sur le marché a démontré, au préalable, son efficacité clinique.

Afin de pouvoir entrer en essai clinique, ces nouveaux traitements doivent avoir démontré, lors d'essais précliniques, qu'ils reposent sur un rationnel scientifique solide et des preuves de concept d'efficacité in vitro mais aussi in vivo.

Pour ce faire, les entreprises du médicament utilisent des modèles précliniques de cancers pertinents, permettant d'obtenir des données consolidées.

L'objectif de ce projet est de déterminer in vivo les propriétés anti tumorales de traitements innovants (petite molécule et/ou biothérapie) afin d'identifier rapidement ceux ayant un potentiel d'efficacité fort en clinique et concentrer les études ultérieures sur ces seuls traitements d'intérêt. L'étude de ces traitements innovants permettra également de définir les informations nécessaires pour choisir leur posologie en vue de leur utilisation future en clinique.

Ce projet se base sur l'utilisation de modèles de tumeurs humaines xénogreffées sur souris ou PDX (pour Patient Derived tumor Xenografts). Ces modèles développés au cours des dernières années sont les seuls actuellement qui permettent de reconstituer sur animal la complexité des tumeurs humaines. Les résultats obtenus sur ces modèles permettent ainsi une réelle extrapolation en médecine humaine.

Ils permettent ainsi de valider le potentiel thérapeutique de ces traitements dans des modèles reproduisant les interactions entre les différents types cellulaires telles que les cellules endothéliales et les cellules stromales mais aussi reproduisant la diffusion sur l'ensemble de l'organisme (invasion, métastase) ainsi que les propriétés de métabolisation de l'organisme qui ont un impact significatif sur la distribution et la disponibilité des traitements.

Ces études in vivo constituent une des nombreuses étapes du développement préclinique d'un médicament, réduite au strict nécessaire grâce aux données obtenues préalablement in vitro, mais ce travail sur organisme entier ne peut être Remplacé.

Les études d'efficacité in vitro effectuées préalablement permettent de sélectionner les traitements ayant un potentiel anti tumoral intéressant. Ces étapes ont pour but de réduire globalement le nombre de thérapies à tester in vivo sans pour autant pouvoir remplacer totalement les essais sur animaux.

Les modèles utilisés sont parfaitement maîtrisés, notamment le taux de prise de greffe, ceci permet de raffiner les projets en l'utilisant que le nombre d'animaux strictement nécessaire.

Le raffinement passe également par une standardisation de l'hébergement des animaux de l'enrichissement de leur milieu et par l'application de points limites stricts.

Le projet dont la durée sera de 2 années sera constitué de 10 études visant à évaluer différents traitements thérapeutiques, chacun sur 30 modèles de PDX. Les études comprendront chacune 24 animaux au maximum, soit un total de 7200 animaux au maximum.

8432 Ce projet cherchera à comprendre comment les métastases cérébrales issues de tumeurs primaires distantes (sein, poumon, foie) s'implantent, nichent et se développent dans le cerveau. Cette compréhension est fondamentale pour que l'on puisse développer des traitements anti-métastases fiables. Cependant, il n'est aujourd'hui pas possible de diagnostiquer la présence de ces métastases à un stade précoce, c'est-à-dire lorsqu'elles ont encore une taille très réduite. Cela est dû au fait que

les techniques d'imagerie in vivo ne sont pas assez précises et sensibles pour les détecter. Il est alors nécessaire de procéder à l'analyse histologique, toujours très limitée pour le cerveau humain. Même dans le cas de modèles animaux pour la recherche fondamentale, les techniques histologiques restent très peu efficaces pour révéler des micro-métastases. Cela est dû au fait que les cellules tumorales sont très hétérogènes et observent de nombreuses mutations génétiques qui rendent leur identification très aléatoire.

Nous avons développé une technologie d'imagerie histologique qui permet l'analyse chimique du cerveau d'une souris en 3D et avec une résolution de quelques microns seulement. Elle s'appuie sur la microscopie X à haute résolution et la spectro-microscopie infrarouge, une technique émergente en histologie biomédicale et clinique. Nous pouvons maintenant mettre cette technologie d'analyse en œuvre pour la recherche des micro-métastases dans le cerveau de souris. Ce sera une innovation significative dans la recherche sur les cancers à métastases dans le cerveau. Notre objectif est d'identifier les métastases, aussi petites soient-elles, en analysant leurs caractéristiques chimiques propres. Nous voudrions aussi comprendre comment les cellules tumorales s'implantent dans le cerveau, c'est-à-dire caractériser ce qui fait leur niche (le microenvironnement). Parfois chez l'homme, ces cellules tumorales « dorment » de longues années avant de se développer en nouvelles tumeurs, lesquelles sont le plus souvent incurables. Comprendre ce phénomène sera l'objectif majeur de l'étude.

Pour cela, nous n'avons pas d'autre choix que d'analyser l'intégralité du cerveau de souris après que ce soient développées des tumeurs primaires, avec une forte suspicion de développement de métastases cérébrales. Nous devons recourir à des modèles animaux pour produire les connaissances de base sur le phénomène de niche et de « dormance » des micro-métastases. Nous devons aussi analyser tout le cerveau car nous n'avons a priori aucune information sur les zones cérébrales où se nichent les micro-métastases. Le recours à des biopsies est donc exclu car nous devons être exhaustifs. Cependant, nous serons aussi très précautionneux sur l'utilisation des animaux. Il s'agira pour nous de réduire au maximum le nombre de souris pour l'étude, mais aussi de réduire autant que possible la souffrance induite par les expérimentations. Afin de réduire la souffrance, les animaux sont acclimatés dans la pièce avant le début des manipulations, une injection d'anesthésique/analgésique est appliquée en préopératoire et l'analgésie est réitérée 12 à 24h après l'implantation. Les soins sont toujours effectués par les mêmes expérimentateurs animaliers afin de réduire le stress, de plus, l'hébergement des animaux est enrichi par des tunnels en polycarbonate. De la nourriture humidifiée est mise dans la cage pour faciliter l'alimentation post-opératoire. Le nombre d'animaux pourra être réduit au maximum car nous produirons des bases de données de référence (animaux sains notamment), qui ne nécessiteront plus de nouvelles expérimentations pour les études suivantes. Nous concentrerons aussi nos études sur l'apparition précoce des métastases, c'est-à-dire bien avant qu'elles ne se développent en grosses tumeurs secondaires, dont les effets sur le fonctionnement de l'organisme sont délétères. Cela limitera beaucoup la souffrance des animaux. Ce projet nécessite l'utilisation de 600 animaux sur cinq années d'expérimentation pour les différents modèles tumoraux envisagés.

L'avantage majeur de notre étude sur les cerveaux de souris est que cela représente un modèle préclinique de référence. Nos travaux, tous les résultats qui en découleront et les bases de données constituées seront exploitables à l'infini pour le développement de nouveaux traitements anti-métastases. Nous rendrons donc nos données publiques et totalement accessibles pour tout organisme de recherche ou entreprise qui les solliciteraient pour les besoins de recherche ou de R&D pharmaceutique.

8433 Au cours du cycle sexuel, l'hormone hypophysaire FSH stimule la croissance folliculaire et la production d'œstradiol et d'inhibine dans l'ovaire. En retour, ces hormones ovariennes vont réguler la production de FSH par l'hypophyse. Les niveaux circulants de FSH sont très élevés lors de la mini-puberté de l'enfance qui survient juste après la naissance chez les mammifères, mais également au cours du vieillissement ovarien physiologique (ménopause) ou accéléré par des traitements gonadotoxiques (chimiothérapie) en raison de l'appauvrissement de l'ovaire en follicules ovariens. Bien que l'action de la FSH dans l'ovaire soit relativement bien documentée, on ignore encore quel est l'effet de ses très fortes concentrations lors du vieillissement ovarien (pré-ménopause) ou lors de traitements comme la chimiothérapie qui entraîne la destruction des follicules ovariens. On sait que

dans la période infantile, lorsque les concentrations de FSH deviennent élevées, la FSH ne peut plus stimuler la croissance des follicules ovariens. En revanche, au cours de la préménopause ou après chimiothérapie on ignore quel est l'impact des concentrations élevées de FSH sur la croissance folliculaire et la cyclicité. Les données obtenues au cours de la période infantile suggèrent que cela pourrait limiter la croissance folliculaire et amplifier ainsi les anomalies de la cyclicité. Si cela était le cas, l'abaissement des concentrations de FSH chez les patientes traitées par chimiothérapie pourrait permettre une reprise plus rapide de la cyclicité et ainsi d'envisager une grossesse à plus court terme après la fin du traitement anti-cancéreux.

Le but de ce projet est d'établir l'impact des fortes concentrations de FSH sur la fonction ovarienne à l'âge adulte, et en particulier sur la croissance folliculaire et la cyclicité. Pour cela, nous allons développer un modèle de souris de vieillissement ovarien prématuré induit par traitement chimiothérapique couramment utilisé chez les patientes atteintes d'un cancer du sein (le cyclophosphamide ou CPA). Nous analyserons dans ce modèle l'impact du CPA sur les follicules ovariens, sur les niveaux circulants de FSH et sur la cyclicité. Nous étudierons l'effet potentiellement bénéfique pour la reprise de la cyclicité d'un traitement pharmacologique avec un antagoniste de la GnRH qui permet d'abaisser les concentrations de FSH.

L'utilisation d'un modèle animal est incontournable pour cette étude pour plusieurs raisons : 1/La fonction ovarienne, que ce soit la croissance des follicules et leur capacité endocrine, est étroitement régulée par le complexe hypothalamo-hypophysaire. 2/ L'impact du fonctionnement ovarien sur les organes reproducteurs et la fertilité ne peut être étudié qu'in vivo. 3/ Les follicules ovariens comportent plusieurs types cellulaires qui dialoguent par l'intermédiaire de facteurs de croissance et d'hormones dont le taux varie en fonction du stade développemental et du cycle sexuel. Or il n'existe pas à ce jour de modèle in vitro permettant de restituer cette complexité. Le nombre d'animaux a été déterminé pour permettre la mise en évidence d'une différence de 20% entre les groupes traités et les groupes contrôles. Nous utiliserons des approches méthodologiques non dommageables pour l'animal avec le souci d'éviter la douleur (anesthésie) et les conditions d'hébergement seront enrichies avec des nids végétaux et des maisonnettes cartonnées. Avec l'exigence d'appliquer la règle de réduction, remplacement et raffinement, cette étude de 3 ans comptera 72 souris femelles C57Bl6 adultes et 80 souris C57Bl6 nouveau-nés, soit au total 152 souris.

8434 La listériose est une maladie causée par la bactérie *Listeria monocytogenes* (Lm), qui est présente dans l'alimentation. Cette maladie induit une mortalité élevée (30% des patients infectés), même lors d'un traitement adéquat. Lm est également une bactérie modèle qui permet d'étudier le système immunitaire de l'hôte.

Les premières étapes de traversée de la barrière intestinale épithéliale par Lm ont été étudiées. Cependant, le devenir de Lm une fois l'épithélium intestinal franchi ainsi que la réponse immunitaire induite lors de la traversée de la barrière intestinale restent mal définis. Des données précédemment obtenues suggèrent une balance entre un signal pro-inflammatoire induit par l'infection et une inhibition de la réponse immunitaire par Lm au niveau intestinal, qui dépendent du site de traversée de la barrière intestinale par la bactérie.

Notre projet est donc de comprendre quels sont les mécanismes permettant à Lm d'induire ou d'inhiber une réponse immunitaire au niveau intestinal, en le corrélant à la localisation de Lm dans le tissu. Les conséquences de cette réponse de l'hôte sur l'infection seront également étudiées.

Ce projet nécessitera 990 souris sur 5 ans.

Le bénéfice attendu de ce projet est de mieux comprendre la phase intestinale de la listériose afin de savoir comment Lm agit sur l'hôte et quelle est la réponse immunitaire induite en retour. Ces connaissances pourront être utilisées pour le développement de vaccins dérivés de Lm ou pour la modulation de la réponse immunitaire intestinale (meilleure délivrance de traitements par exemple).

Le niveau de sévérité attendu est léger pour 235 animaux et modéré pour 755 animaux. Les animaux seront infectés avec une souche pathogène de *Listeria* mais seront mis à mort avant la survenue des symptômes liés à une infection avancée.

Le recours à l'animal est nécessaire car nous étudions une réponse globale de l'hôte à une infection. Une approche réductionniste in vitro ne pourra pas nous apporter les informations obtenues dans l'organisme entier.

L'estimation du nombre d'animaux utilisés correspond au nombre minimum nécessaire à un traitement statistique correct.

Les souris seront hébergées en groupe, avec une litière appropriée et des matériaux de nidification. Les doses d'infection sont calculées pour minimiser les effets indésirables tout en permettant des observations scientifiques. Les animaux atteignant les points limites seront mis à mort.

8435 Le Diplôme Universitaire de Technologie (DUT) en Génie Biologique option « Analyses Biologiques et Biochimiques » (ABB) prévoit un enseignement pratique dédié à l'expérimentation animale afin de mettre en application les connaissances théoriques dispensées en Physiologie animale et Pharmacologie. L'un des objectifs pédagogiques du DUT ABB est de permettre aux étudiants de s'insérer professionnellement en pharmacologie expérimentale dans des industries pharmaceutiques et des laboratoires publics. A ce titre, la mise en évidence d'activités pharmacologiques sur rats anesthésiés apparaît primordiale car elle constitue une part importante des phases d'essais précliniques dans le développement d'un nouveau médicament. Par ailleurs, « la mise en évidence et la quantification d'une activité pharmacologique in vivo » constitue une compétence exigée par le Programme Pédagogique National des IUT.

Pour répondre à cette problématique, ces études sont organisées sur plusieurs séances de travaux pratiques réparties sur l'ensemble des deux semestres de la deuxième année. Le but de ces TP est de permettre aux étudiants d'être initiés aux techniques opératoires sur rats anesthésiés via la mise en place d'un cathéter intraveineux, afin de mesurer et de quantifier l'impact de substances pharmacologiques administrées sur différents paramètres physiologiques (fréquence respiratoire, fréquence cardiaque, pression artérielle...).

Quel que soit le TP considéré, aucun animal n'est réveillé à l'issue de la séance. Il est prévu d'utiliser 180 rats maximum par année universitaire soit 540 rats maximum sur les 3 années du projet. Ce nombre est un compromis nécessaire pour permettre à tous les étudiants de s'impliquer dans cette démarche expérimentale afin de répondre aux exigences techniques du diplôme tout en réduisant au maximum l'utilisation d'animaux en accord avec la règle des 3Rs (Réduction et Remplacement). Les conditions d'hébergement et d'expérimentation des animaux utilisés sont optimisées afin de s'assurer du bien-être des animaux avant et pendant leur utilisation (Raffinement).

8436 Dans le cadre d'un projet de recherche portant sur le contrôle du développement tumoral par un agent pathogène X notre laboratoire a acquis de nouvelles souches du dit agent pathogène par le Centre de Ressources Biologiques. Souches pour lesquelles il est indispensable de tester la virulence sur notre modèle murin C57Bl/6 avant de pouvoir les intégrer dans un protocole expérimental. Cette expérience nécessitera l'utilisation de maximum 135 souris C57Bl/6 dans le respect de la règle des 3R.

- Remplacement : Aucune stratégie de remplacement n'est disponible pour tester la virulence d'une souche in vivo.

- Réduction : Le nombre d'animaux est réduit grâce à notre expérience qui nous permet de cibler au plus juste la dose optimale et donc de réduire les lots.

- Raffinement : Les souris sont hébergées en accord avec les directives européennes et dans un environnement enrichi (objets en cellulose pour faire un nid ou à ronger). Dans cette étude de virulence, aucun type de médication pouvant interférer avec la multiplication de l'agent pathogène ne peut être utilisé.

8437 L'hypertension artérielle chronique (HTA) touche un quart de la population adulte mondiale et est un facteur de risque majeur de nombreuses maladies cardiovasculaires. Parmi ces maladies, les accidents vasculaires cérébraux (AVC) constituent la première cause de mortalité chez la femme et la troisième chez l'homme. Malgré les efforts et les progrès scientifiques réalisés ces dernières années dans la compréhension de la physiopathologie de l'AVC, les stratégies thérapeutiques disponibles

restent largement insatisfaisantes. Il est donc primordial de poursuivre des études précliniques visant à mieux comprendre les effets de la préexistence de l'HTA sur le développement de l'AVC et ainsi de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques pour cette maladie cérébrovasculaire. Les vaisseaux sanguins cérébraux appartiennent à un grand réseau cellulaire appelé unité neurogliovasculaire qui comprend les neurones, la microglie, les astrocytes et les péricytes. La régulation du débit sanguin cérébral nécessite l'activation coordonnée et précise de l'ensemble des éléments de cette unité fonctionnelle. Toutefois, les effets de l'HTA sur cette unité dans sa globalité ne sont pas bien connus. De plus, au sein de cette unité, la microglie détient un rôle stratégique de principal médiateur de l'inflammation cérébrale, mécanisme probablement impliqué dans la mise en place de l'HTA mais encore peu étudié. Ainsi, l'objectif de cette étude sera d'évaluer l'impact de l'HTA sur le fonctionnement de l'unité neurogliovasculaire et particulièrement sur le fonctionnement microglial de façon à évaluer son potentiel thérapeutique. Pour traiter cette question, le projet sera basé sur l'utilisation de la microscopie biphotonique chez la souris en conditions physiologiques et en contexte d'hypertension artérielle. La microscopie biphotonique représente une technique de choix permettant de réaliser des images structurales et fonctionnelles *in vivo* à l'échelle cellulaire, avec une grande résolution spatiale et temporelle du cerveau intact. L'HTA sera induite par sténose de l'artère rénale, un modèle bien décrit dans la littérature. Cette étude sera réalisée en suivant le principe des 3R (Raffiner, Réduire, Remplacer). Raffiner : les animaux seront hébergés aux normes requises et le milieu sera enrichi. Une stratégie d'analgésie sera mise en place en pré et post opératoire. Réduire : la technique de microscopie utilisée (microscopie biphotonique) permet de réaliser plusieurs analyses sur le même animal et donc de réduire le nombre d'animaux utilisés. Remplacer : la souris est utilisée comme modèle de choix dans la littérature pour étudier l'hypertension artérielle chronique, cette pathologie ne pouvant être reproduite *in vitro*. Le nombre de souris prévu pour cette étude est 50.

8438 Les petits poissons pélagiques représentent à la fois des espèces clefs de voûte de l'écosystème de par leur place centrale dans le réseau trophique mais aussi un enjeu économique très important pour les pêcheries méditerranéennes. Depuis 2008, les stocks d'anchois et de sardines du Golfe du Lion ont subi des changements drastiques avec une perte de biomasse et une évolution brutale dans la structure en âge et en taille de la population, entraînant une diminution très nette des captures françaises. Des travaux récents montre que la diminution de la biomasse résulterait d'une baisse conjointe de la croissance et de la condition corporelle des anchois et des sardines, et non d'une baisse du nombre de poissons. Ce changement semble pointer vers un défaut de prise énergétique et donc d'alimentation de ces espèces qui se traduirait par une surmortalité préférentielle des classes d'âges les plus élevées. Cette surmortalité ne semble liée ni à la pêche, ni à une pression de prédation importante que ce soit de la part des thons rouges ou des mammifères marins. Ces premiers travaux ont donc mené à la réévaluation du stock de sardines du Golfe du Lion, qui est maintenant reconnu en déséquilibre écologique. L'hypothèse alimentaire ainsi que la relation proies/dynamique de la population de ces petits pélagiques n'ont toutefois pas encore été démontrées. Le présent projet s'attachera donc à tester l'hypothèse d'un contrôle de la croissance de ces espèces par l'alimentation. A cette fin, il couplera l'étude de l'évolution temporelle du plancton et des stocks de petits pélagiques avec une approche expérimentale permettant de mieux comprendre l'effet de l'alimentation sur la biologie de ces petits pélagiques. Une phase préliminaire a permis de mettre au point et de raffiner les techniques de pêche, mise en captivité et maintien de ces animaux. Elle a également permis de définir comment manipuler ces poissons, en mettant au point des techniques d'anesthésie, de marquage et de biométrie. Cette phase préliminaire nous a permis d'une part de nous assurer de la faisabilité de ce projet, mais également de mieux prendre en compte la règle des 3R pour le projet à venir. Si (1) le Remplacement n'est pas possible dans ces expériences (le but étant de comprendre les mécanismes mis en jeu chez cette espèce en particulier), la (2) Réduction sera prise en compte au niveau de la pêche (adaptation de la technique de pêche), et (3) le Raffinement comprendra l'optimisation des conditions d'élevage pour cette espèce (nombre d'individus suffisants, diminution du stress, installations et méthodes adaptées).

Les animaux seront capturés en milieu naturel lors de 4 pêches effectuées à l'aide d'une senne tournante à des périodes différentes (Octobre 2016 & 2017, Mars 2017 & 2018) et ensuite acclimatés en bassins de quarantaine, puis maintenus en bassins expérimentaux. Un total d'environ 1200 sardines par pêche est visé afin de pouvoir mener à bien les différentes expériences, ainsi que de maintenir autant que possible un comportement « naturel » de banc qui diminuera le stress des

individus. Après acclimatation, les sardines seront réparties dans différents bassins de même qualité d'eau différant uniquement par une alimentation différente (nombre, taille et contenu énergétique des proies). Le marquage et des biométries régulières permettront de suivre leur croissance et condition corporelle tout au long de l'expérience. Une attention particulière sera également portée à la maturation des gonades et à la reproduction (collection des œufs, etc.).

8439 Le but de ce projet est de former, entraîner et/ou ré-entraîner les utilisateurs à la réalisation/maîtrise de techniques d'administration et de prélèvement.

Cette formation/ré-entraînement s'adresse aux concepteurs et aux personnels appliquant des procédures expérimentales, détenteurs d'un niveau concepteur ou réalisateur en expérimentation animale et souhaitant être encadrés pour la réalisation de certains gestes techniques afin d'apprendre à travailler en totale autonomie et en aisance technique.

Les gestes expérimentaux seront : administration d'un composé en voie SC (sous-cutané), en IM (intramusculaire) en ID (intradernale), en IP (intrapéritonéale), en IV (intraveineuse (veine de la queue, sinus rétro-orbitale)). Administration d'un composé par voie orale (gavage), administration d'un composé par voie intratibiale.

Effectuer des prélèvements sanguins, des prélèvements d'urine, des prélèvements de LCR (liquide céphalo rachidien), des prélèvements de bile.

Conformité/exigences de remplacement, de réduction et de raffinement :

Le nombre d'animaux utilisés est réduit au maximum tout en permettant la répétition des actes expérimentaux dans le respect des volumes tolérés pour chaque utilisateur. Pendant toute la période qui précède la mise en œuvre du projet, les animaux auront reçu un enrichissement adapté. Les animaux utilisés seront issus d'élevages destinés à l'euthanasie et les procédures seront sans réveil, les animaux seront anesthésiés (générale + locale), analgésiés (analgésiques centraux) et mis sur tapis chauffants. Cependant, les administrations d'un composé par voie IV (veine de la queue) et par voie orale (gavage) pourront être pratiquées sur animaux vigiles et dans le cadre d'une procédure classée légère.

Les animaux utilisés dans ce projet sont des animaux de réforme issus des élevages. Le nombre total d'animaux utilisés dans le projet sera de 300 souris et 200 rats maximum.

8440 Malgré un traitement par irradiation du cerveau en son entier, le traitement des métastases cérébrales reste malheureusement à caractère palliatif puisqu'il consiste en une prise en charge non spécifique et tardive de la maladie. La problématique réside donc dans la nécessité d'apporter un traitement plus spécifique et plus précoce des métastases cérébrales. Nous proposons donc, dans ce projet, d'évaluer l'intérêt thérapeutique d'un traitement de radiothérapie interne ciblant une protéine spécifiquement exprimée par les métastases cérébrales lors de leur développement précoce au niveau du cerveau. L'efficacité de cette approche plus personnalisée sera comparée au traitement standard de radiothérapie complète du cerveau.

L'évaluation de l'efficacité de cette nouvelle approche thérapeutique se fera par un suivi hebdomadaire du volume tumoral en imagerie IRM. Cette caractérisation de l'efficacité de traitement en imagerie sera combinée à une étude de survie ainsi qu'à des études immunohistologiques.

Concernant la règle des 3R :

« Remplacement » : Ce projet ne peut pas s'effectuer sur des modèles de remplacement in vitro ou in silico car les tumeurs sont connues pour être multicompartimentales, c'est-à-dire qu'au-delà du simple compartiment de la cellule tumorale existent les composantes hypoxique et inflammatoire notamment bien connues pour jouer un rôle important dans la réponse aux traitements comme la radiothérapie. L'utilisation des modèles in vivo complets intégrant tous les compartiments des tumeurs cérébrales ainsi que le fonctionnement global de l'organisme reste indispensable.

« Réduction » : L'utilisation des méthodes d'imagerie non invasive se conforme à la réglementation en vigueur en matière de réduction du nombre d'animaux car permet de suivre à différents temps l'évolution de la tumeur sans nécessiter l'euthanasie de plusieurs animaux à chacun de ces temps.

« Raffinement » : Les différents protocoles ont été pensés de manière à limiter au maximum la souffrance animale par l'administration d'agents analgésiques et anesthésiques ou par le choix de points limites cohérents. De la même manière, le bien-être animal a aussi été pris en compte dans ce projet.

Ce projet sera réalisé sur des souris Nude nmri au nombre de 250.

8441 La dépression est une pathologie hétérogène qui induit chez l'homme des symptômes à la fois psychologiques (effets sur l'humeur), comportementaux (troubles du sommeil, comportements suicidaires) et physiologiques (effet sur l'appétit, sur l'attention, sur le sommeil). Chez l'animal, il existe différents tests permettant d'évaluer les effets antidépresseurs de candidats médicaments. Parmi eux, le test de renoncement appris, est basé sur le fait que des rats ayant subi un stress auquel ils ne peuvent échapper et qu'ils ne peuvent pas contrôler, présentent ultérieurement un ensemble de comportements altérés et en particulier des déficits cognitifs observés dans différents tests de mémoire. On parle de renoncement (ou résignation) appris et leur comportement est assimilé à un état dépressif. Chez l'homme, c'est un phénomène observé chez le patient dépressif.

Le projet consiste à évaluer la capacité de différents candidats médicaments à réverser le déficit de rats dits "résignés" dans un test d'évitement actif. En effet, ce type de test a été montré, par de nombreuses études, sensible aux effets de composés antidépresseurs, c'est-à-dire qu'une molécule ayant des effets antidépresseurs pourra réverser ce déficit.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 3600 animaux sur 5 ans.

La conception de ce projet prend en compte la règle des 3R : remplacement, réduction et raffinement

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

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par 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 les moins invasives possibles, le suivi des signes cliniques et des points limites et le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.

8442 La demande mondiale en viande de volaille est en augmentation depuis plusieurs années, elle devrait d'ailleurs croître de 20% entre 2015 et 2025 selon l'Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. L'objectif de ce projet est d'améliorer les connaissances concernant les besoins nutritionnels des volailles, afin de mettre en œuvre une alimentation efficace, optimisant les performances zootechniques de ces animaux. L'aliment peut en effet se définir comme un mélange de matières premières et d'additifs apportant les nutriments nécessaires à la croissance des animaux. Dans le cadre de ce projet, les performances des volailles (gain de poids, mesures de consommation et d'efficacité alimentaire) ainsi que certains critères sérologiques sont mesurés dans un dispositif en petites cases ou en cages. En effet, ces types de logement permettent de réduire considérablement le nombre d'animaux mis en essai, en augmentant la puissance statistique du dispositif expérimental. Les animaux sont logés en collectif dans le but de favoriser les interactions sociales, et disposent de litière, afin de leur assurer un confort thermique et de leur permettre d'exprimer leurs comportements exploratoires de fouissage, grattage. Les seules procédures appliquées aux animaux seront des prises de sang ; elles seront réalisées par un personnel compétent et formé à l'acte ainsi qu'à la contention, afin de maintenir les animaux dans des conditions rassurantes. L'état de santé des animaux sera vérifié quotidiennement par les techniciens animaliers de l'établissement utilisateur. Si un animal présente des signes de stress ou de douleur comme une perte d'appétit ou des difficultés à se déplacer, il sera écarté de l'étude, pourra être hébergé dans un dispositif de case au sol, et

recevra un traitement adapté. La complexité des paramètres influant sur les besoins nutritionnels et leurs interactions ne permet pas d'une part d'utiliser uniquement des modèles alternatifs (modélisation, méthodes in vitro). D'autre part, la réponse à un régime alimentaire (digestion, absorption, utilisation, ...) est spécifique à chaque espèce. Les données de ce projet étant destinées aux différentes filières avicoles, il est indispensable de pouvoir conduire les travaux sur les espèces suivantes : poulets, canards, et ce sur les tranches d'âge correspondant aux périodes d'élevage habituelles respectives de ces espèces. Le projet aura une durée de 5 ans, impliquant au total 8300 volailles (8000 poulets, 300 canards), ce qui permettra de réaliser 6 essais, comprenant chacun entre 300 et 2000 volailles. Pour chaque essai, 6 à 12 stratégies seront comparées. Cet effectif a été défini comme l'effectif minimal permettant d'identifier comme significatifs des écarts de performances de croissance en logements collectifs. En fin d'essai, 95% des animaux rejoindront le circuit de consommation de viande.

8443 Les métapneumovirus aviaires (AMPV) sont responsables chez différentes espèces d'oiseaux (poulet, dinde canard, autres espèces) de troubles respiratoires de type sinusite ou rhinotrachéite, ainsi que de troubles génitaux chez les animaux en âge de se reproduire (chutes de ponte).

Les travaux antérieurs du laboratoire (laboratoire de référence de l'Organisation Mondiale de la Santé animale pour les AMPV) ont contribué à mettre en évidence une diversité génétique et antigénique chez les AMPV qui sont répartis en 4 sous-groupes A, B, C et D. Parmi ces travaux, une série d'expérimentations animales, commencée en 2014, a permis d'éclaircir le pouvoir pathogène des 4 sous-groupes d'AMPV ainsi que leurs caractéristiques de réplication chez trois espèces de volaille cible des AMPV, dinde, poulet et canards exempts d'organismes pathogènes spécifiés (EOPS).

Cette série d'expérimentations a notamment fait intervenir deux AMPV-C isolés chez des espèces différentes (dinde ou canard). Les résultats ont mis en évidence que chacune de ces souches, malgré leur proximité génétique, étaient bien adaptées à son espèce d'origine. Cette adaptation pourrait être associée aux protéines de surface SH et G qui sont impliquées dans les interactions virus-cellule cible et présentent les plus grandes variations au niveau génétique. De plus, un motif moléculaire de la protéine SH semble être spécifique à l'espèce d'origine de ces deux souches. Cette même protéine a été décrite dans plusieurs articles scientifiques comme ayant une implication sur la réplication virale, la réponse immunitaire et la pathogénèse associée in vivo chez plusieurs virus infectant diverses espèces appartenant toutes au même ordre de classification.

Un système développé au laboratoire, basé sur l'AMPV-C isolé chez le canard (AMPV-C Fr) permet de régénérer des virus portant des modifications génétiques précises. En tenant compte du potentiel rôle de la protéine SH dans la détermination de l'espèce cible d'un virus, le système a été utilisé pour produire des virus recombinants de l'AMPV-C Fr dont la protéine SH a été partiellement, ou totalement, échangée avec celle de l'AMPV-C isolé chez la dinde, avec l'accord du Haut Conseil des Biotechnologies.

Cette demande concerne une série de quatre expérimentations (deux sur canards et deux sur dindes) qui feront chacune appel à 65 sujets (soit un total de 130 canards et 130 dindes). Chaque expérimentation se déroulera sur une période de 21 jours. L'objectif de chaque expérimentation proposée est d'inoculer, en conditions expérimentales standardisées, à des canetons ou dindonneaux EOPS de 18 et 28 jours d'âge respectivement, ces virus SH recombinants par voie intranasale. Durant la période d'expérimentation, les signes cliniques seront suivis et notés selon des grilles de notation standardisées, des écouvillons des voies respiratoires supérieures seront réalisés et des sujets seront euthanasiés à différents temps pour prélever le sang et les organes-cibles de l'infection. Ces échantillons serviront au suivi du niveau d'excrétion et de réplication virale des différents virus inoculés mais aussi de la réponse immunitaire induite par l'infection. Lors des précédentes expérimentations, il a été constaté que l'AMPV-C Fr induit des signes respiratoires modérés uniquement chez le canard (jetage nasale, râle, éternuement) avec un rétablissement au bout de 7 à 10 jours après l'infection. Ce même virus n'a pas induit de signe clinique chez la dinde. A l'inverse, l'AMPV-C dinde induit des signes respiratoires modérés exclusivement chez la dinde (jetage nasale, ronflements, éternuement) avec un rétablissement au bout de 7 à 10 jours après l'infection.

En respectant la règle des 3R (réduire, raffiner, remplacer).

Réduire : L'effectif retenu correspond au nombre d'animaux minimal permettant la mise en œuvre de tests statistiques non-paramétriques de Kruskal-Wallis.

Raffiner : L'AMPV n'induit pas ou de très légers signes cliniques en conditions expérimentales (jetage nasal, râle, ronflements, étouffement) cependant une euthanasie compassionnelle sera pratiquée si l'un des signes cliniques suivants est observé : prostration, absence de réaction après sollicitation sonore ou visuelle, anorexie ou impossibilité de s'abreuver ou de s'alimenter, détresse respiratoire. De plus l'environnement sera enrichi avec des objets suspendus pendant toute la durée d'expérimentation.

Remplacer : Les espèces cibles étant la dinde et le canard et du fait qu'il n'existe pas de méthodes alternatives, ces travaux nécessitent le recours à l'expérimentation animale.

8444 Les maladies des petits vaisseaux cérébraux sont responsables de 25% des accidents vasculaires cérébraux et on estime qu'elles sont la cause de 40% des démences.

La maladie appelée CADASIL, pour artériopathie cérébrale autosomique dominante avec infarctus sous-corticaux et leuco-encéphalopathie, est due à une mutation d'un gène unique, appelé NOTCH3. Ce gène intervient dans la formation des vaisseaux sanguins et sur leur fonctionnement. Son anomalie a un impact sur l'irrigation du sang dans le cerveau, c'est la forme génétique la plus fréquente de maladie des petits vaisseaux cérébraux.

Cette pathologie évolue sur plusieurs années avant de se manifester cliniquement. Elle se traduit par des crises de migraines avec troubles de la vision ou des crises d'épilepsie, des troubles cognitifs, des accidents vasculaires cérébraux et évolue vers un ralentissement moteur et intellectuel.

La méconnaissance des mécanismes de cette maladie, en particulier au stade initial, fait qu'on ne dispose à ce jour d'aucun traitement spécifique.

Il existe un modèle murin qui récapitule les principales manifestations cérébrovasculaires de la maladie CADASIL, avant l'apparition des symptômes cliniques. Ce modèle a l'avantage de présenter des déficits cérébrovasculaires sévères et d'installation précoce, ce qui rend l'étude de leurs mécanismes d'autant plus aisée.

L'objectif de cette étude est d'analyser le couplage neuro-vasculaire dans ce modèle de souris, en combinant simultanément une approche électrophysiologique et une nouvelle approche d'imagerie fonctionnelle ultrasonore dans une structure cérébrale.

Ce projet se déroulera sur une période de 2 ans et nécessitera au total l'utilisation de 60 souris. Le nombre d'animaux utilisés est réduit au minimum nécessaire pour réaliser les tests statistiques.

Les enregistrements électrophysiologiques et l'imagerie seront réalisés dans le même temps opératoire, sous anesthésie générale et avec des antalgiques pour éviter toute douleur à l'animal. Les souris seront mises à mort à la fin de l'expérience toujours sous anesthésie.

La réalisation de ce projet devrait déboucher sur une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie CADASIL et permettre à terme l'identification de stratégies thérapeutiques dans cette maladie.

8445 La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est la maladie neurodégénérative la plus fréquente du neurone moteur adulte (2 à 3 nouveaux cas pour 100 000 habitants). A ce jour, elle reste incurable et fatale. La SLA présente des formes sporadiques et familiales ; parmi ces dernières environ 20% des cas découlent de mutations des gènes Sod1, Fus et Chmp2B. Sur cette base génétique, diverses lignées de souris transgéniques ont été mises au point, qui reproduisent les principaux symptômes de la maladie et sont à la base des recherches précliniques menées à l'heure actuelle dans le domaine de la SLA.

A l'échelle cellulaire, la SLA se caractérise par la dégénérescence de deux types de neurones moteurs : les neurones moteurs supérieurs, localisés dans le cortex cérébral et qui connectent le cerveau à la moelle épinière, et les neurones moteurs inférieurs, situés dans le tronc cérébral et la moelle épinière et qui relaient les informations du cerveau vers les muscles striés squelettiques.

Un nombre croissant d'études génétiques, cliniques, histopathologiques et fonctionnelles récemment menées chez les patients SLA convergent vers une origine de la maladie au sein du cortex cérébral. Notamment, la stimulation magnétique transcrânienne a permis la mise en évidence d'une hyperexcitabilité corticale précoce, systématique, et négativement corrélée à la survie des patients.

Les objectifs de cette étude sont de déterminer :

- 1) si les modèles murins de SLA reproduisent une hyperexcitabilité corticale telle que rapportée chez les patients,
- 2) à quel moment cette hyperexcitabilité corticale se met en place,
- 3) si cette hyperexcitabilité corticale peut-être atténuée ou corrigée par des manipulations génétiques ou pharmacologiques au sein du cortex cérébral.

En complément des études de survie déjà en cours sur ces modèles animaux, cette étude fonctionnelle nous permettra de déterminer si l'hyperexcitabilité corticale peut être utilisée comme biomarqueur pronostique de la maladie, et quel est son niveau de corrélation avec l'atteinte des neurones moteurs supérieurs.

Cette étude concerne un total de 144 animaux sur une durée de 5 ans.

Cette approche est conforme à la règle des trois R :

Réduction :

- l'étude proposée n'a jamais été réalisée auparavant, et ne consiste donc pas une répétition d'autres études;
- l'étude proposée sera réalisée sur un nombre d'animaux nécessaire et suffisant pour générer des données fiables, ne nécessitant pas de répétition ultérieure (n=8);
- l'étude proposée n'impliquera que des souris mâles, pour limiter les possibilités de variations liées au sexe. Pour limiter le nombre de portées générées, les femelles seront systématiquement utilisées dans le cadre d'autres études menées au sein du laboratoire.

Raffinement :

- l'étude a été pensée de manière à limiter au maximum l'inconfort ou la douleur des animaux. La procédure nécessite une chirurgie dont le déroulement et les étapes successives seront suivies de près pour limiter au maximum l'inconfort des animaux ou une potentielle douleur.
- les souris étant des animaux grégaires, elles seront laissées entre individus issus d'une même portée afin de leur permettre de maintenir les interactions sociales qui limitent un potentiel stress ou mal-être des animaux, sauf ponctuellement, le temps des enregistrements d'électrocorticographie.

Remplacement : dans le domaine de recherche sur la SLA, le modèle animal le plus pertinent est à l'heure actuelle la souris. Pour intégrer la complexité de la pathologie, il est indispensable de travailler sur des animaux homéothermes ayant une forte dépense énergétique. En effet, le métabolisme et la consommation énergétique ont été récemment montrés comme étant des éléments importants de la pathologie, tant chez la souris que chez l'homme. Outre ces aspects, l'utilisation d'invertébrés comme la drosophile ou le nématode se heurte à une organisation du système nerveux qui n'a pas la complexité requise et ne permet pas de répondre aux questions cliniques posées.

8446 La greffe de moelle osseuse allogénique, c'est-à-dire réalisée avec un donneur volontaire sain de moelle osseuse ou de cellules souches mobilisées reste le seul traitement permettant d'obtenir la guérison dans les leucémies aiguës et certains cancers. L'effet anti-tumoral de la greffe est lié à la reconnaissance des cellules leucémiques ou cancéreuses du receveur par le système immunitaire du donneur qui déploie une attaque cellulaire dirigée contre les cellules malades du receveur reconnues comme étrangères et permet ainsi la guérison. Malheureusement, les cellules du système immunitaire du donneur sont incapables de faire la différence entre une cellule malade et une cellule saine qui porterait les mêmes caractéristiques immunologiques. L'attaque des cellules normales de certains organes du receveur est responsable de la maladie du greffon contre l'hôte (GVH pour « Graft-versus-Host » en anglais). Cette complication de la greffe de moelle osseuse se développe dans 50% des cas en moyenne et est à l'origine de dysfonctionnements d'organes sévères conduisant souvent au

décès des patients. Il est donc urgent de trouver des stratégies qui permettraient de diminuer le risque de développer une GVH sans altérer l'effet anti-tumoral de la greffe.

Parmi les stratégies intéressantes l'injection de cellules régulatrices capables de diminuer la GVH, est la voie de recherche la plus prometteuse. Ainsi, les Cellules Souches Mésoenchymateuses (CSM) prélevées dans la moelle osseuse de donneur (CSM-MO) ont été rapportées comme potentiellement efficaces dans la littérature chez les patients atteints de GVH sévère. Cependant le recueil de CSM-MO nécessite un prélèvement de moelle osseuse sous anesthésie générale d'un donneur, avec un rendement d'autant plus faible que l'âge du donneur avance. La gelée de Wharton (tissu conjonctival du cordon ombilical) contient des CSM qui ont une plus grande capacité d'auto-renouvellement, prélevable au décours de l'accouchement sans controverse éthique et constitue ainsi une source alternative de CSM. L'isolement des CSM à partir de la gelée de Wharton, et leur expansion selon les bonnes pratiques cliniques est maîtrisée par notre équipe. Ces CSM-GW ont été largement étudiées et possèdent les mêmes propriétés morphologiques, phénotypiques, immunogéniques et immunorégulatrices que les CSM-MO. Après avoir étudié et déterminé *in vitro* les mécanismes d'interaction des CSM-GW avec le système immunitaire, nous souhaitons maintenant analyser leur effet *in vivo* dans un modèle préclinique de GVH, par injection de greffons de cellules sanguines mononucléées humaines dans la souris. Ce modèle de xénogreffe est le modèle de référence dans la littérature pour toute étude préclinique de cellules humaines injectées comme thérapie cellulaires dans la greffe et ne peut donc être remplacé par un autre modèle. La souris utilisée appelée NSG pour NOD.Cg-Prkdcscidll2rgtm1Wjl/SzJ ou dite NOD/SCID/Gamma-c KO est dépourvue de système immunitaire excepté quelques monocytes et macrophages. Elle est donc capable d'accepter un greffon de cellules sanguines humaines, et de développer une maladie de type « GVH ». Nous souhaitons suivre l'évolution de ces CSM-GW, leurs interactions avec l'immunité adaptative, leurs effets protecteurs vis-à-vis de la GVH et leur innocuité dans ce modèle préclinique. Les souris seront donc hébergées dans un environnement protégé, c'est à dire dans un portoir ventilé, cage avec capot et filtre HEPA®, alimentation irradiée et eau stérile. L'enrichissement du milieu sera assuré par du papier à l'intérieur de chaque cage, stérilisé par autoclavage au préalable pour maintenir les conditions d'hygiène indispensable. Le projet d'étude *in vivo* permettra de :

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

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

8447 La prise en charge des douleurs chroniques constitue un challenge majeur. Ceci s'applique particulièrement dans le cas des douleurs neuropathiques induites par les chimiothérapies anticancéreuses. Les molécules antalgiques utilisées à l'heure actuelle présentent des effets indésirables trop importants pour être utilisées de façon chronique (c'est le cas de la morphine) ou ne sont pas

suffisamment efficaces (c'est le cas des antidépresseurs et antiépileptiques). Dans certains cas, la seule solution est de diminuer la chimiothérapie et par là même l'effet anti-tumoral.

L'objectif de ce projet est d'évaluer l'effet antalgique de candidats-médicaments dans un modèle de douleur neuropathique induite par chimiothérapie anticancéreuse chez le rat.

Un test comportemental de référence permettant d'évaluer l'augmentation de la sensibilité à la douleur sera utilisé pour mesurer les seuils douloureux chez les animaux et évaluer l'effet antalgique de molécules de référence et de l'élément d'essai.

La majorité des animaux développeront une hyperalgésie (seuil de tolérance à la douleur diminué par rapport au seuil avant injection).

Le seuil de douleur sera mesuré pendant la phase d'induction de l'hyperalgésie par chimiothérapie et après traitement avec une molécule de référence positive (ex : gabapentine) ou avec l'élément d'essai.

Pour ce projet, le nombre total d'animaux est estimé à 1080 rats (sur 5 ans).

Ce projet est conçu en accord avec le principe des 3Rs :

Remplacement : dans le cadre du développement de certains nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets analgésiques. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.

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

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 les moins invasives possibles, le suivi des signes cliniques, la détermination des points limites et le recours aux procédures d'euthanasie compassionnelle dès que nécessaire.

8448 La schizophrénie est un trouble psychiatrique qui se manifeste par des problèmes de perte de contact avec la réalité tels que des hallucinations (symptômes dits positifs), des problèmes de contact social (symptômes dits négatifs) et des troubles cognitifs. Des médicaments appelés antipsychotiques sont utilisés dans le traitement de la schizophrénie pour stabiliser les patients et éviter les crises.

Chez le rat, il a été démontré que les antipsychotiques ont la capacité de supprimer de façon sélective la réponse d'évitement conditionnée (en anglais CAR ou "Conditioned Avoidance Response"), rendant ainsi ce test utile pour la sélection de nouvelles molécules ayant un effet antipsychotique. Dans un environnement de test à 2 compartiments, l'animal va apprendre qu'il peut éviter de recevoir un choc électrique modéré juste en changeant de compartiment, le choc étant conditionné à l'apparition d'un son ou d'un signal lumineux (=réponse conditionnée). Un composé présentant un effet antipsychotique va réduire cette réponse d'évitement conditionnée.

Chaque étude de ce projet va consister à évaluer la capacité de différents candidats médicaments à réduire la réponse d'évitement conditionnée chez des rats préalablement entraînés dans le test de CAR.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 360 animaux sur 5 ans.

Ce projet suit la règle des 3R.

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

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

Raffinement : dans ce projet, le raffinement est obtenu par 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 les moins invasives possibles, le suivi des signes cliniques et des points limites et le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire (application de points limites).

8449 La clathrine est connue pour son rôle dans la formation de petites vésicules permettant l'entrée de molécules spécifiques dans différents types de cellules. Nous avons identifié un nouveau rôle de la clathrine dans la cellule musculaire. En effet, la clathrine y forme de petites vésicules, mais la face interne de la membrane des fibres musculaires est également constellée de larges plaques de clathrine, et cela spécifiquement au niveau de sites d'adhésion permettant la transmission de la force de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule musculaire. Ces plaques de clathrine constituent un talon d'Achille de la cellule musculaire et leur destruction expérimentale dans le muscle de souris provoque une maladie musculaire associée à une perte de force contractile. Cette expérience permet de mettre en lumière le rôle non conventionnel de la clathrine dans la transmission de la force musculaire, mais cette déplétion brute et artificielle n'est pas retrouvée dans la nature, et la contribution de la clathrine dans des pathologies musculaires humaines est actuellement inconnue. Nous avons identifié des variants subtils de la clathrine et de ses protéines associées chez des patients atteints de pathologies musculaires congénitales diagnostiquées (dystrophie myotonique), ou de cause inconnue.

L'objectif de ce projet de 5 ans est de reproduire ces variations de la clathrine et de ces protéines associées, individuellement ou de manière combinée, dans le muscle de 384 souris normales afin d'étudier leurs contributions au développement de pathologies musculaires. Cette recherche est mise en place chez l'animal (souris) car aucune méthode de remplacement n'existe pour évaluer un muscle mature au microscope ou pour mesurer la force que le muscle est capable de produire lors de contractions. Enfin le protocole d'étude proposé constitue un raffinement et une réduction du nombre d'animaux utilisés dans la mesure où il permet d'induire localement les variations souhaitées par de simples injections intramusculaires (comparable au geste de vaccination) sans faire appel à la production d'animaux transgéniques nécessitant des colonies entières d'animaux sur plusieurs générations.

8450 Ce projet a pour objectif de déterminer la tolérance, la biodisponibilité et le profil pharmacocinétique de produit vétérinaire chez le chien.

Pour le développement d'un produit vétérinaire, les différentes voies d'administrations et formulations candidates doivent être évaluées afin de déterminer celle qui est la plus adaptée pour le traitement de l'animal.

Chaque test sera réalisé comme suit : pour chaque formulation 3 à 12 chiens seront traités à la posologie recommandée par le fabricant. Pour limiter le nombre d'animaux utilisés, chaque chien pourra recevoir séquentiellement chacune des formulations. Entre chaque test, des périodes de repos suffisantes seront respectées.

La pharmacocinétique reposera sur des prélèvements sanguins, et/ou sur des prélèvements cutanés par différentes méthodes adaptées (ex : skin stripping et/ou biopsies cutanées de diamètre le plus petit possible) permettant une analyse de la biodisponibilité du traitement. En fonction des interventions, les animaux pourront être tranquilisés ou anesthésiés et une analgésie adaptée sera assurée.

D'autres analyses non invasives pourront être réalisées telles que la fluorescence de la peau sous lampe UV ou l'examen visuel du pelage.

Pour garantir la qualité des résultats, les animaux pourront être hébergés individuellement afin d'éviter qu'ils ne se lèchent entre eux après l'application du traitement. Dans tous les cas ce temps sera réduit au minimum et les animaux resteront en contact visuel, olfactif et sonore avec leurs congénères. Tout sera mis en œuvre pour limiter le stress qui pourrait être induit sur les animaux avec entre autre, une amplification des actions de socialisation.

L'estimation du nombre d'animaux requis pour ce projet sur 5 années est de 120 chiens.

L'utilisation de chiens sur ce projet est justifiée par le fait qu'ils représentent l'espèce cible du produit et qu'il n'existe pas de méthode de remplacement pour ce type de test.

8451 Les capacités de défense immunitaire apparaissent comme des marqueurs intéressants dans l'analyse du risque environnemental puisqu'ils permettent d'intégrer les effets de stress environnementaux chimiques, physiques et biologiques. De plus, une déstabilisation des paramètres immunitaires peut induire de fortes modifications au niveau de la santé des individus et/ou d'une population en augmentant par exemple la sensibilité à certains pathogènes et par conséquent la mortalité piscicole. Cette hypersensibilité induite est une hypothèse crédible pour expliquer les mortalités piscicoles observées dans certains cours d'eau français.

Une première évaluation des effets des stress environnementaux sur la physiologie des poissons autochtones met souvent en exergue un stress immunotoxique fort. Ce stress immunotoxique, probablement lié aux polluants environnementaux, pourrait ainsi engendrer une mortalité piscicole en présence de pathogènes. Dans l'optique d'utiliser les immunomarqueurs en tant que biomarqueurs, il est important de connaître les variations maximales, positives et négatives, que ces paramètres peuvent atteindre sans provoquer de mortalité individuelle en cas de double stress polluant-pathogène. Pour y répondre, il semble primordial d'évaluer lors d'un double stress (contamination chimique avec des toxiques de référence ; contamination biologique avec des endotoxines bactériennes) sur les capacités de réponse de nos organismes et les valeurs limites à partir desquelles l'animal ne pourra plus s'adapter à la situation. Initialement, il est donc nécessaire de définir, en condition contrôlée de laboratoire, par l'intermédiaire de toxiques de référence (trois immunostimulateurs et trois immunosuppresseurs), l'évolution de nos réponses immunitaires lors d'un stress chimique. Dans un second temps, nous rechercherons comment les réponses immunitaires vont évoluer en présence d'une double contamination chimique et biologique. En lien avec les 3R, nous nous basons sur des organismes vivants afin de prendre en compte l'intégralité des réponses physiologiques tout en réduisant au maximum le nombre d'animaux nécessaires (1500 épinoches) pour obtenir une significativité des résultats (test de puissance). Enfin, dans le cadre du raffinement, les animaux ont bénéficié d'une eau adaptée en termes de paramètres physico-chimiques et d'une période d'acclimatation suffisamment longue pour limiter le stress dû aux expérimentations.

Au cours de ce projet, toutes les expérimentations sont en accord avec la Directive 2010/63/EU, qui s'intéresse à la protection et au bien-être des animaux utilisés à des fins scientifiques, pour le maintien et l'utilisation des animaux en laboratoire. L'épinoche à trois-épines est utilisée du fait de sa large utilisation en analyse du risque environnemental et de sa présence dans les rivières françaises.

8452 Les vaisseaux sanguins du corps humain peuvent être déficients suite à une maladie ou à l'âge, ou peuvent nécessiter des modifications afin de faciliter les soins, dans le cadre de maladies chroniques. Afin de remplacer les tissus défaillants, ou d'apporter des modifications au système vasculaire du patient (pontage par exemple), il existe des vaisseaux artificiels, qui sont catégorisés comme des dispositifs médicaux de classe IIb ou III (= dispositifs invasifs de type chirurgical destinés à un usage à long terme dans le système circulatoire périphérique ou central).

Ces dispositifs médicaux, du fait du risque potentiel pour le patient, doivent être évalués chez l'animal : il s'agit d'une exigence réglementaire européenne.

Notre projet vise à évaluer différents dispositifs vasculaires, tels que les prothèses vasculaires ou fistules artério-veineuses artificielles.

Pour cela nous utiliserons au maximum, sur 5 ans, 120 chèvres et 120 moutons. Cela correspond à l'évaluation de plusieurs dispositifs : le nombre d'animaux utilisés pourra donc être inférieur, en fonction des résultats obtenus et du nombre de dispositifs testés.

Le nombre d'animaux utilisés est conforme aux préconisations des normes européennes sur l'évaluation pré-clinique des dispositifs médicaux, et correspond au nombre minimum permettant d'obtenir des résultats exploitables scientifiquement.

Pour chaque espèce, un programme d'hébergement, de soins et d'enrichissement du milieu est mis en place. Les animaux seront opérés dans des conditions similaires aux patients humains. Une

attention particulière sera apportée aux soins post-opératoires, afin de limiter au strict minimum la douleur ressentie par les animaux : ils seront examinés chaque jour par du personnel qualifié, et recevront des médicaments antidouleur adaptés, selon les bonnes pratiques vétérinaires. Dès cette période passée, les animaux pourront être hébergés en groupe, en stabulation libre ou au pré.

8453 La maladie d'Alzheimer (MA) est provoquée par l'accumulation anormale de protéines dans le cerveau : des dépôts de fragments d'une protéine appelée bêta-amyloïde s'accumulent dans les espaces entre les cellules nerveuses, et des fibres torsadées d'une autre protéine appelée tau s'accumulent à l'intérieur des cellules. Ces accumulations protéiques provoquent la destruction et la mort des cellules nerveuses qui entraînent d'abord des pertes de mémoire puis d'autres symptômes de la MA comme un état dépressif, des troubles de la personnalité, des difficultés à effectuer les tâches quotidiennes.

A ce jour, les médicaments disponibles ne permettent que de prendre en charge les symptômes de la maladie. Le développement de nouvelles thérapeutiques permettant de stopper/ralentir la progression de la maladie constitue donc un enjeu majeur et correspond à un effort de recherche substantiel.

Le but de ce projet est de permettre l'évaluation de molécules neuroprotectrices et/ou de molécules agissant sur l'évolution de la maladie.

Dans ce projet, la MA sera modélisée chez le rongeur, par l'injection intracérébrale de fragments de protéines ou par la surexpression de protéines induisant des déficits cognitifs dans différents tests de mémoire et comportementaux.

D'autres évaluations pourront être réalisées sur ces mêmes animaux comme par exemple une étude préalable d'évaluation de la locomotion spontanée des animaux.

Le nombre prévisionnel maximum d'animaux est de 2800 rats sur 5 ans.

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

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le rat car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la maladie d'Alzheimer. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le rat est l'espèce qui est la plus adaptée à ce type de modèle d'étude.
- Réduction : Un nombre minimal et homogène d'animaux par groupe est utilisé afin d'exploiter de façon rigoureuse et efficace les résultats des expériences et afin d'avoir un nombre d'animaux suffisant pour réaliser une analyse statistique.
- Raffinement : Dans ce projet, le raffinement est obtenu par 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 les moins invasives possibles, le suivi d'éventuels signes cliniques, la recherche des points limites, le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire et le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux.

Des prélèvements de plasma ou de tissus pourront être effectués sur les animaux en phase terminale.

8454 Ce projet s'inscrit dans le cadre de l'étude du muscle squelettique et concerne plus précisément la caractérisation des mécanismes contrôlant le fonctionnement même de la cellule musculaire squelettique, c'est-à-dire le couplage excitation-contraction.

Dans ce contexte, le but de notre projet est de concevoir et d'utiliser de nouveaux outils moléculaires capables de détecter deux paramètres biologiques au cœur même du couplage excitation-contraction, à savoir le calcium cellulaire et les variations du potentiel électrique.

Les méthodes actuelles ne permettent en effet pas de faire une analyse complète de ces paramètres.

Au contraire, ces nouvelles biosondes sont conçues pour répondre à des variations locales du potentiel électrique de la membrane ou à des variations locales de la concentration calcique.

Le projet vise à déterminer parmi plusieurs biosondes, celles qui offrent des caractéristiques optimales pour suivre les phénomènes étudiés (calcium, potentiels électrochimiques, mécanismes intracellulaires de la contraction musculaire).

Une fois validées, les biosondes pourront être utiles à la caractérisation des atteintes pathologiques du couplage excitation-contraction, notamment dans des maladies musculaires congénitales, dans le but ultime que des traitements adaptés puissent être ainsi conçus.

Le modèle de cette étude est la souris. Une intervention légère sera réalisée sur les muscles de l'animal afin qu'il exprime les biosondes, en vue de faire ensuite des prélèvements de muscles sur lesquels l'analyse du couplage excitation-contraction sera faite. Les biosondes pourront ainsi s'exprimer dans deux des muscles des membres postérieurs après transfert de l'ADN correspondant dans les cellules musculaires.

Le transfert d'ADN sera réalisé grâce à une électroporation intramusculaire, technique précédemment utilisée au laboratoire. Cela consiste à effectuer des injections sous-cutanées d'ADN, puis à appliquer un bref champ électrique permettant de faire pénétrer l'ADN à l'intérieur des cellules. Ce sera réalisé uniquement sur un territoire restreint de muscles présents dans la paume des membres postérieurs de souris adulte (c'est-à-dire la face ventrale du pied). Ces muscles sont en effet suffisamment superficiels pour être facilement accessibles à l'électroporation et comportent des cellules musculaires courtes, ce qui facilite l'étude du couplage excitation-contraction effectuée ultérieurement.

Cette étude sera réalisée après 1 à 10 semaines d'hébergement, temps pendant lequel l'ADN transféré dans les cellules musculaires permettra l'expression des biosondes. Le prélèvement des muscles sera alors réalisé après mise à mort des animaux et le couplage excitation-contraction sera analysé sur tissus frais et sur les cellules musculaires isolées à partir de ces muscles.

Remplacement : La mise au point de ces sondes a été réalisée en utilisant des modèles d'études en remplacement du modèle souris (cultures cellulaires). Cependant le couplage excitation-contraction est très immature dans les cellules musculaires en culture et sa caractérisation ne peut donc se faire que sur des cellules adultes, prélevées chez l'animal. Le muscle squelettique de souris adulte est un modèle pertinent, ses caractéristiques étant suffisamment similaires à celles du muscle squelettique humain adulte pour en constituer un modèle approprié.

Réduction : Au total, un maximum de 224 souris seront nécessaires pour les 5 ans du projet. Cependant le nombre d'animaux sera le minimum raisonnable pour démontrer ou infirmer statistiquement les hypothèses. L'analyse du couplage excitation-contraction se fera avec une ou deux souris par semaine. Il est possible qu'au cours de l'étude des résultats significatifs soient obtenus avec un nombre plus faible d'animaux : dans ce cas le nombre d'animaux utilisé sera revu à la baisse.

Contrairement par exemple à une lignée transgénique, tous les animaux soumis au transfert transitoire d'ADN intramusculaire constitueront des animaux expérimentaux.

Raffinement :

- L'électroporation est réalisée sur l'animal anesthésié et sous analgésie.
- La procédure a pour but l'expression transitoire in vivo des protéines d'intérêts sans que d'autres paramètres comme le degré de maturité cellulaire, la structure tissulaire ou le fonctionnement musculaire ne soient modifiés. Les conditions utilisées lors de l'électroporation ont été raffinées en réduisant au maximum la durée et l'intensité du champ électrique, dans le but d'éviter des dommages tissulaires ou une réaction inflammatoire pouvant altérer les cellules musculaires et nuire au bien-être animal.
- Le risque estimé que l'expression des biosondes altère sévèrement la motricité ou la physiologie générale de l'animal est faible pour différentes raisons : 1/ l'expression sera restreinte temporellement (durée d'expression au maximum de 10 semaines) 2/ l'expression sera restreinte spatialement, puisque seuls les muscles de la paume de la patte arrière seront ciblés ; Cette restriction spatiale est d'autant plus importante que toutes les cellules des muscles ciblés n'exprimeront pas les canaux : d'après des résultats préalables, seules 15% des cellules, appelées aussi fibres musculaires,

expriment en moyenne les protéines exogènes. 3/ les biosondes n'ont pas de fonction propre dans la cellule, ce sont des outils moléculaires de détection.

- Un suivi post-opératoire minutieux sera mis en place le jour et le lendemain de la procédure. Un suivi global sera également réalisé pendant toute la durée de l'hébergement. Afin de limiter le stress, les animaux seront hébergés par petits groupes et en milieu enrichi (tunnels et matériel de nidification).

8455 L'utilisation d'hormones de synthèse, pour la conduite des élevages a des impacts négatifs connus sur l'environnement. L'élevage porcin conventionnel est conduit en bandes successives, généralement espacées de 3 semaines, dans lesquelles toutes les femelles sont inséminées, mettent bas et sont sevrées le même jour. Pour y parvenir, les éleveurs réalisent une synchronisation des cycles de leurs femelles reproductrices, en distribuant dans l'alimentation pendant 18 jours un analogue de progestérone (progestagène de synthèse). 5 jours après l'arrêt de la distribution, les femelles viennent spontanément en chaleur et sont donc inséminées « en même temps ».

Cette pratique présente un intérêt certain pour organiser le travail mais aussi pour constituer des lots homogènes de porcelets (même âge, même poids).

Le cahier des charges pour l'élevage biologique interdit d'avoir recours aux hormones de synthèse. La synchronisation des cycles avec un progestagène de synthèse n'est donc pas possible dans ce système de production sans qu'il n'existe de réelles alternatives.

Des travaux récents montrent que des composants dits "phytoprogestagènes" présents dans certaines plantes peuvent influencer la durée du cycle sexuel chez la ratte et certains primates.

Nous souhaitons tester l'effet de ces "substituts naturels" en élevage porcin et remplacer la distribution des hormones de synthèse par la distribution directe dans l'alimentation de 2 plantes contenant de forts niveaux de phytoprogestagènes, une légumineuse et un tubercule.

Nous utiliserons 5 lots expérimentaux de 6 cochettes soit 30 femelles pubères

- 1 lot témoin qui ne recevra aucune supplémentation
- 1 lot témoin "positif" qui recevra la progestérone de synthèse
- 1 lot supplémenté avec la légumineuse
- 1 lot supplémenté avec le tubercule
- 1 lot supplémenté avec les 2 plantes pour vérifier l'effet cumulatif

Nous mesurerons :

- les consommations moyennes (mesure de la quantité distribuée et des refus),
- l'intervalle entre deux chaleurs par détections quotidiennes des chaleurs au verrat,
- la progestérone sanguine 15 et 20 jours après la première chaleur, l'œstradiol et la progestérone salivaire tous les 5 jours, ces marqueurs permettant d'évaluer le stade du cycle.

Pour le dosage de la progestérone sanguine, pour chaque femelle, 2 prises de sang seront réalisées à la veine jugulaire après contention de l'animal.

La règle des 3R a été prise en compte :

-Remplacement : l'utilisation de l'animal est nécessaire pour documenter les réponses hormonales et comportementales.

-Réduction : Un calcul du nombre de sujets nécessaires a été réalisé afin d'estimer au plus juste le nombre d'animaux à inclure dans le projet. Le nombre et la fréquence des prises de sang pour le suivi hormonal a été réduit au minimum. Par ailleurs des collectes de salive, non invasives et non stressantes (simple présentation d'un coton à mâchouiller) seront réalisées, afin de mettre au point des dosages hormonaux dans la salive qui remplaceront à terme les dosages sanguins.

-Raffinement : Les conditions d'hébergement sont raffinées par la mise à disposition d'une litière constituée d'une couche épaisse de paille, permettant une activité de fouille et de comportement exploratoire tel que préconisé dans le cadre des recommandations européennes (rapport EFSA).

8456 La douleur inflammatoire chronique est un problème récurrent qui affecte 20% de la population mondiale. Les effets physiques et psychologiques de cette douleur persistante peuvent impacter durablement la qualité de vie, les relations sociales, le maintien d'une activité professionnelle et peuvent donc être lourdes de conséquences pour le malade et son entourage.

Les médicaments actuels (anti-inflammatoires non stéroïdiens, opiacés...) ont un effet partiel souvent associé à des effets secondaires qui limitent leur utilisation. Le besoin de nouveaux traitements anti-inflammatoires est une vraie nécessité.

Pour évaluer les propriétés analgésiques anti-inflammatoires de candidats médicaments, il est nécessaire de disposer de modèles expérimentaux spécifiques et prédictifs. Pour cela, le rongeur, rat ou souris, reste un modèle sur lequel il est possible d'induire une inflammation généralement localisée, aigue ou chronique, suite à l'administration d'un agent capable de produire de l'inflammation. L'évaluation de cette douleur se fait au moyen de stimulations mécaniques ou thermiques légères ou modérées. Notre projet consiste à évaluer l'activité pharmacologique analgésique de candidats médicaments administrés avant ou après l'injection de l'agent inflammatoire.

Il n'existe pas de méthode alternative permettant d'évaluer cette activité et susceptible de remplacer ces modèles expérimentaux in vivo. Les études sur la douleur inflammatoire chronique ne pourront être envisagées que si le candidat médicament aura montré au préalable une activité analgésique dans un modèle de douleur inflammatoire aigue.

L'effectif par groupe peut être réduit par :

- une sélection préalable des animaux dans le but de constituer des groupes plus homogènes,
- une évaluation quantitative de la douleur permettant de réduire la variabilité des mesures.

Le raffinement des modèles s'effectue au travers des conditions d'hébergement qui sont améliorées par des dispositifs d'enrichissement (tunnel par exemple), mais aussi au nombre de tests et à la durée de l'évaluation de la douleur.

La démonstration d'une activité analgésique dans l'un des modèles conduirait à poursuivre le développement clinique du candidat médicament testé avec pour bénéfique une réduction des traitements complémentaires anti-douleur (ex : opiacés).

Le nombre d'animaux nécessaire pour ce projet est calculé en fonction de la variabilité observée de chaque mesure et de l'effet pharmacologique minimum attendu des produits testés. Un effectif maximum de 2880 rats sur 5 ans (soit en moyenne 600 rats par an) est nécessaire pour la conduite de ce programme.

8457 Les situations cliniques imposant une reconstruction osseuse font appel à différentes techniques, toutes encore imparfaites à l'heure actuelle. Deux approches sont actuellement utilisées :

(1) la greffe d'os autologue qui expose à une certaine morbidité sur le site donneur et pour laquelle les quantités d'os disponibles sont limitées,

(2) la méthode de la membrane induite par le ciment (méthode de Masquelet) qui se déroule en 2 temps et présente donc l'inconvénient d'imposer 2 interventions chirurgicales.

Ce projet a pour but d'évaluer une nouvelle approche de reconstruction osseuse plus efficace et se déroulant en un seul temps de chirurgie.

Cette étude expérimentale se déroulera chez le rat et constitue un préalable indispensable à la réalisation d'essais cliniques chez l'homme.

Le rat est l'espèce animale la moins évoluée et de taille suffisante pour permettre des études de chirurgie orthopédique.

Le modèle expérimental est le fémur de rat adulte ayant fait l'objet d'une résection osseuse segmentaire calibrée et stabilisée par une plaque d'ostéosynthèse en titane.

Les différentes étapes de chirurgie sont réalisées sous anesthésie chimique profonde et la douleur post opératoire est gérée par l'administration de substances antalgiques de façon systématique

pendant les 24h suivant la chirurgie puis de façon optionnelle ensuite en cas de signes de douleur observés.

Au cours de la chirurgie réparatrice le déficit osseux est comblé par une entretoise en polymères biocompatibles et biodégradables (PLA-PGA) thermoformée et recouverte d'un film réticulé chargé en un facteur osteo-inducteur la Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP2). L'utilisation de la BMP2 pour favoriser la régénération osseuse est validée par la FDA depuis 2002 mais son mode d'administration et son dosage restent à optimiser en termes d'efficacité et d'effets secondaires.

Dans cette étude le film réticulé doit agir comme un véritable réservoir de principe actif permettant une délivrance locale de faibles doses de BMP2 avec une meilleure efficacité qu'en présentation soluble et limitant les effets indésirables.

Notre objectif est d'évaluer la réalité d'une ostéo-formation suivant cette méthode réparatrice innovante.

115 rats seront utilisés dans ce projet :

- Une étude préliminaire portant sur 45 rats permettra d'évaluer qualitativement différentes densités de réticulation du film ainsi que plusieurs concentrations en BMP2 (15 conditions expérimentales à n=3). Le nombre réduit au minimum d'animaux dans cette étude permettra d'obtenir des résultats qualitatifs qui permettront le design optimisé de la seconde étude.

- Une seconde étude portant sur 70 rats sera menée pour obtenir des résultats statistiquement significatifs avec la densité de réticulation de film et la concentration en BMP2 qui auront permis d'obtenir les meilleurs résultats dans l'étude préliminaire.

Conformément à la règle des 3R :

Remplacer : Les tests in vitro permettront de réduire le nombre de composés à tester. Ces études précliniques sont nécessaires avant de réaliser des essais cliniques chez l'homme.

Réduire : L'approche statistique et notre expérience nous permettent de réduire le nombre d'animaux au minimum afin d'obtenir des résultats exploitables. Tous les rats seront utilisés. Les nombres de rats indiqués par condition sont nécessaires pour une analyse statistique fiable, évitant de refaire l'expérience.

Raffiner : Le rat est l'espèce animale la moins évoluée et de taille suffisante pour permettre des études de chirurgie orthopédique.

8458 Les systèmes agroforestiers sont reconnus depuis quelques années dans le cadre de l'atténuation du changement climatique, notamment en climat tropical (accords de Kyoto par exemple). Les travaux menés sur ces systèmes sont considérés comme des options crédibles pour la lutte contre le changement climatique. L'importance de ces systèmes sur le volet adaptation en climat tempéré est par contre moins étudiée.

Sur le terrain, depuis la réforme des réglementations engagée en 2001, le nombre de projets récents progresse et leur surface dépasse les 10 000 ha en 2012. Cette augmentation pose la question de l'accompagnement sur le terrain et soulève surtout de nouvelles questions de recherche, notamment dans une perspective de prise en compte grandissante de l'agroécologie. L'agroforesterie est d'ailleurs citée comme un système de production adapté aux enjeux agro-environnementaux actuels, et devant faire l'objet d'une recherche approfondie.

Pour le secteur de l'élevage, dans un contexte de changement climatique, responsable en partie de la stagnation des rendements agricoles, les éleveurs doivent faire face à un contexte économique difficile : l'indice IPAMPA (Indice des prix d'achat des moyens de production agricole) montre une constante hausse depuis sa création, il est passé de 98 en 2005 à 134 aujourd'hui. Couplé à des sécheresses régulières qui affectent l'autonomie fourragère et plus globalement l'autonomie alimentaire, ces évolutions fragilisent les exploitations.

La fréquence des sécheresses impacte fortement le prix de la paille et des céréales, augmentant les charges des exploitations d'élevage. Les éleveurs doivent aujourd'hui anticiper les conséquences de ces évolutions. Cela passe entre autre par l'intégration de nouvelles dynamiques annuelles des productions fourragères : creux estival de plus en plus accentué, avance de la production printanière

et une production hivernale non négligeable qui permettrait de limiter les conséquences du changement climatique. Toutefois, à très long terme, d'ici la fin du siècle, une dégradation rapide des rendements des prairies est possible, avec pour conséquence l'obligation dans de nombreuses zones de devoir rentrer les animaux l'été, ou du moins les affourager à l'extérieur.

Dans un futur proche l'allongement des périodes de pâturage est considéré comme l'une des clés d'adaptation des systèmes d'élevage herbivores pour répondre aux évolutions de contexte qu'il soit climatique ou économique. L'allongement de la durée de pâturage, vers des périodes de moindre production fourragère, sur prairies ou sur parcours, permet des économies importantes en fourrages stockés et en concentrés sans dégrader les performances des animaux.

L'implantation d'arbres en prairie peut avoir une influence considérable en modérant la température de l'air et du sol, en accroissant l'humidité relative et d'autre part, en limitant l'évapotranspiration et le stress azoté des cultures. Ces effets bénéfiques à la croissance des cultures sont mis à profit dans de nombreux systèmes d'agroforesterie. Par transposition aux exploitations d'élevage herbivore, l'arbre serait un réel élément de soutien et d'adaptation au changement climatique pour les prairies pâturées par des ruminants mais également en assurant un rôle de protection des animaux vis-à-vis des intempéries ou du soleil durant les périodes hivernales et estivales.

L'expérimentation que nous voulons mettre en place a pour objectif de quantifier l'intérêt de l'arbre dans des prairies pâturées par des ovins. Elle durera 6 mois soit toute la période de pâturage et utilisera 30 brebis adultes suitées d'agneaux doubles soit 90 animaux qui seront subdivisés en 3 lots de 10 brebis, elle sera mise en œuvre sur cinq ans. Les trois traitements seront (1) un lot témoin dit nu (une prairie avec un seul arbre isolé de façon à avoir un minimum d'abri pour les animaux), (2) traitement à densité moyenne (une parcelle avec 60 arbres /ha) et (3) traitement à forte densité (parcelle avec 150arbres/ha). La taille des parcelles (traitements) est de 0.8ha pour permettre aux brebis d'y résider toute la période pâturage (de mai à novembre). Les brebis seront sorties 3 semaines après la mise bas, au printemps. Les agneaux seront sevrés à 12 semaines d'âge et seront alors sortis du dispositif. L'utilisation de brebis suitées nous permet d'être dans un système productif et d'avoir des indications des performances des animaux (réalisations de pesées et de note d'état corporelle tous les 15 jours), de faire des observations comportementales (sociales et alimentaires) à différentes périodes et en conditions climatiques contrastées pour estimer le bien-être des animaux et d'avoir une indication sur l'état de santé des animaux (suivi de l'état parasitaire des animaux en même temps que les pesées). Les niveaux d'infestation et leurs conséquences sur les animaux seront contrôlés par des coproscopies qui nous permettront de rapidement identifier si un animal a une charge parasitaire trop importante qu'il conviendra alors de traiter avec un anthelminthique chimique.

Les animaux seront surveillés quotidiennement par du personnel qualifié pour déceler tout changement anormal de comportement (comportement général, apathie, boiteries). La taille des lots a été calculée afin que les groupes constitués soit suffisamment conséquents pour que les animaux expriment leurs comportements sociaux normaux, tout en limitant le nombre d'animaux utilisé dans ce projet. Les prélèvements rectaux de fèces permettront de suivre l'état parasitaire des animaux mais aussi quantifier l'ingestion des animaux par des mesures de SPIR (spectre proche infrarouge), ceci afin de limiter le nombre et le type de procédures réalisées sur les animaux. Malheureusement l'utilisation d'animaux est indispensable compte tenu des objectifs du projet.

8459 Les difficultés cognitives et le retrait social sont des symptômes invalidants dans le cas de la schizophrénie car les traitements actuels ont des effets limités sur ces symptômes. La recherche de traitement efficace pour ces symptômes représente ainsi un enjeu important. Ce projet exploite les symptômes cognitif et social observés dans le modèle murin de la schizophrénie, c'est à dire des souris traitées à la Phencyclidine, afin de tester l'efficacité des nouveaux composés issus des projets de recherche en Schizophrénie. Bien qu'il soit possible de disséquer les mécanismes d'action des nouveaux médicaments in vitro, les réponses comportementales des animaux suite à ces nouveaux traitements sont des événements difficile à simuler et à prédire par des expériences in vitro. De plus, ces expérimentations permettent de faire un lien avec une éventuelle application clinique. Elles sont ainsi incontournables avant une étude clinique et ne peuvent être remplacées par des expérimentations in vitro.

Afin d'obtenir des résultats statistiquement fiables, nous utiliserons 15 animaux par condition expérimentale. Pour réduire le nombre d'animaux utilisés, le nombre de conditions expérimentales sera optimisé au maximum par étude (jusqu'à 9 groupes expérimentaux) évitant ainsi la répétition des groupes contrôles (groupe avec des animaux normaux, groupe avec des animaux symptomatiques, groupe avec des animaux symptomatiques traités au composé de référence). Le bien-être des animaux est primordial durant les expérimentations. Ainsi un certain nombre de mesures sont mises en œuvre notamment une inclusion de phase d'acclimatation (minimum 1 semaine) avant toute expérimentation, des conditions d'hébergement adaptées (maintien des animaux en groupe sociaux, respect de l'espace minimum pour chaque animal, accès à l'eau et à la nourriture à volonté), un enrichissement de l'environnement (présence de petite maison dans la cage permettant aux animaux de se cacher), une visite quotidienne, une gestion de la douleur suivant une échelle stricte et des points limites bien établis.

Une utilisation de 4050 souris est prévue sur cette période de 5 ans.

8460 La mucoviscidose est une maladie génétique qui induit un défaut d'efflux chlorures lié à la déficience du gène qui code pour une protéine appelée CFTR et la principale cause de morbidité et de mortalité est liée à une obstruction des voies aériennes. A l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement efficace pour tous les patients et d'autres stratégies thérapeutiques doivent être envisagées. Une solution proposée est d'activer d'autres canaux chlorures qui compenseraient le défaut de CFTR et le seul autre canal bien caractérisé est TMEM16A ou ANO1. Une activation de ce canal permettrait une restauration des efflux chlorures de façon indépendante à la protéine CFTR.

Il a été montré qu'il était possible d'activer ANO1 par une molécule thérapeutique (TSB) en agissant sur des petits ARN sur des cellules des voies aériennes. Ces résultats nous ont conduits à effectuer des études pilotes chez la souris dans lesquelles nous avons pu mettre en évidence que les techniques d'administration intranasale et systémique étaient bien tolérées et qu'elles se révélaient actives chez la souris au niveau de la trachée sans entraîner de conséquences négatives observables (comportement, poids...).

Le projet a pour but d'administrer un TSB fluorescent à des souris nude par voie inhalée, systémique ou sous-cutanée pour suivre sa distribution au cours du temps et ainsi déterminer le mode d'administration qui sera utilisé dans les futures études précliniques.

Type d'animaux : souris Nude (sans thymus)

Nombre d'animaux : ce projet impliquera l'utilisation d'un nombre maximal de 12 souris pour une durée maximale de 1 an. Ce 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 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-Réduction-Raffinement :

Dans le cadre de cette étude, nous utiliserons des techniques déjà établies et publiées qui permettent de limiter le nombre de souris aux expériences indispensables permettant d'avoir assez de données pour déterminer le mode d'administration de la molécule. Afin de limiter au maximum le recours aux animaux, nous avons effectué de nombreuses expériences *in vitro* et *ex vivo* (cultures de cellules issues de patients) qui ont montré des résultats positifs. De plus, grâce à nos projets précédents sur la souris qui a reçu les autorisations nécessaires, nous savons que notre molécule n'a pas de conséquence sur la perte de poids ou sur son comportement lors d'une administration intranasale ou systémique. Une prise de poids et une évaluation comportementale seront effectuées quotidiennement pour vérifier le bon état des souris.

8461 Aujourd'hui, les différences concernant le devenir des médicaments dans l'organisme selon le genre, hommes ou femmes, sont encore mal connues. Les études de pharmacocinétique sont très majoritairement menées chez les hommes, si bien qu'il est difficile d'anticiper ou d'adapter les doses de médicaments chez les femmes.

Chez les femmes, la grossesse ajoute de nouvelles spécificités à la pharmacocinétique qui compliquent la prise en charge médicamenteuse des femmes enceintes. De plus, la prise de médicaments chez la femme enceinte induit un risque d'exposition fœtal dont il faut impérativement mesurer l'importance et les conséquences pour le déroulement de la grossesse et le développement de l'enfant.

La prise en charge de maladies chroniques telles que le diabète, le cancer, les maladies infectieuses ou les pathologies neuropsychiatriques comme l'addiction pourrait être améliorée par une meilleure connaissance des paramètres qui conditionnent le devenir du médicament dans l'organisme : la pharmacocinétique. Cela permettrait notamment d'adapter les doses et les modalités de prise des médicaments afin d'en améliorer la tolérance et l'efficacité, dans un objectif de médecine personnalisée. Il est donc important d'identifier les singularités qui pourraient expliquer des différences pharmacocinétiques entre les hommes et les femmes. Chez les femmes, la grossesse s'accompagne souvent de modifications de la pharmacocinétique des médicaments dont les mécanismes ne sont pas toujours bien compris.

Aujourd'hui, la pharmacocinétique clinique repose sur la mesure de la concentration des médicaments dans le sang. Pourtant, c'est bien souvent au niveau des organes et des tissus que s'exerce l'effet pharmacologique des médicaments. Les tissus sont souvent séparés du compartiment sanguin par des barrières biologiques dont le franchissement par les différentes molécules est difficile à prédire et à mesurer. C'est notamment le cas pour la barrière fœto-placentaire, dont le franchissement par des médicaments pourrait entraîner des effets pharmacologiques ou toxiques chez le fœtus.

L'objectif principal de cette étude est i) de mettre en évidence des différences de distribution tissulaire des médicaments entre mâles et femelles, et ii) d'estimer l'exposition tissulaire et fœtale par le médicament étudié lors d'une administration chez la mère. Les médicaments testés correspondent à des pathologies fréquentes chez la femme enceinte pour lesquels on manque d'informations concernant leur pharmacocinétique pendant la grossesse. Ce travail permettra d'identifier de nouveaux paramètres physiologiques qui pourraient expliquer certaines spécificités de la pharmacocinétique des médicaments liées au sexe ou à la grossesse.

Pour ce projet, nous utiliserons des primates non-humains : du point de vue physiologique, la gestation, la structure placentaire et les échanges materno-fœtaux sont très proches de ceux que l'on retrouve chez la femme.

Ce projet s'appuie sur des études préalables menées in vitro et chez le rongeur. Le recours au PNH est nécessaire du fait des différences notables sur le passage des barrières biologiques, notamment placentaire, ne permettant pas une extrapolation entre les rongeurs et les primates 2. Le nombre d'animaux de 12 (6 mâles et 6 femelles) a été réduit au minimum nécessaire pour obtenir des données statistiquement significatives. Les animaux seront nés et élevés à des fins scientifiques dans des élevages agréés. Tous les animaux seront hébergés par paire ou en groupe, et les femelles après mise bas resteront avec leurs nouveau-nés dans leur groupe. L'étude est réalisée sur des mâles et des femelles (gestantes puis hors gestation).

La mise en œuvre de méthodes non invasives de suivi au cours du temps (techniques d'imagerie utilisées en médecine humaine) permet de réduire le nombre d'animaux. La biodistribution des médicaments sera estimée par imagerie utilisant un analogue radiomarké du médicament, dans différents organes chez le mâle, la femelle au cours et hors période de gestation.

Les méthodes expérimentales ont été choisies de façon à éviter toute souffrance lors des interventions (imagerie et prélèvement sanguin), les manipulations des animaux se feront sous anesthésie générale. Des critères d'arrêt sont prévus pour prendre en compte des effets inattendus, ce qui permettra d'intervenir immédiatement, avec un recours au vétérinaire afin de mettre en œuvre les traitements appropriés.

8462 Le but de notre projet est de déterminer le rôle de l'activité neuronale dans la mise en place de connexions fonctionnelles et spécifiques entre les neurones, ces connexions étant indispensables au bon fonctionnement du cerveau. Notre système d'étude est le réseau formé entre deux régions du cerveau, l'olive inférieure et le cervelet (réseau olivo-cérébelleux), bien connu pour son rôle dans le contrôle de la motricité. Des études anatomiques et électrophysiologiques ont progressivement révélé

une cartographie précise de la connectivité établie entre les neurones de l'olive inférieure et les neurones du cervelet. Le réseau olivo-cérébelleux est organisé en modules, chaque module traitant différentes informations sensorielles et motrices spécifiquement. Il est nécessaire de comprendre comment cette organisation est établie au cours du développement pour comprendre comment les informations sont traitées et codées dans le réseau olivo-cérébelleux pour permettre un contrôle moteur adéquat. De plus, cela nous permettra de comprendre comment des déficits dans cette organisation modulaire contribuent à l'étiologie de certaines pathologies et troubles neurologiques du mouvement. Cette organisation modulaire ne peut être reproduite par des systèmes cellulaires. Il est donc nécessaire d'avoir recours à des animaux pour pouvoir comprendre les mécanismes permettant le développement de ce réseau chez les mammifères. Le modèle utilisé sera la souris *mus musculus*. En effet, la souris est devenue un modèle de choix pour l'étude des mécanismes moléculaires régulant les grandes fonctions biologiques. Elle permet l'analyse *in vivo* de ces mécanismes et des conséquences de leurs perturbations à différents niveaux : comportemental, physiologique et moléculaire. Elle permet également de créer des modèles d'étude des pathologies humaines.

Notre but est d'étudier le rôle de l'activité neuronale 1. dans l'établissement d'une organisation modulaire précise et fine dans le réseau olivo-cérébelleux, et 2. dans la régulation des molécules qui contrôlent la formation de ce réseaux neuronal. Pour cela, nous modifierons l'activité neuronale au cours du développement en utilisant l'injection chronique d'harmaline, une molécule qui est bien connue pour augmenter l'activité électrique du réseau olivo-cérébelleux. Nous analyserons ensuite comment cette augmentation d'activité neuronale modifie l'organisation modulaire et l'expression de molécules contrôlant la formation du réseau olivo-cérébelleux. L'harmaline sera injectée de manière unique ou chronique chez la souris à différents stades du développement du réseau et chez la souris mature. Le nombre d'animaux utilisé dans notre projet est réduit à son minimum dans la limite de ce qui est permis pour obtenir des résultats scientifiquement valides. Ainsi, il est nécessaire de reproduire les résultats de manière indépendante et d'avoir plusieurs échantillons pour éviter les différences dues à la variabilité biologique. Nous prévoyons donc l'utilisation d'un total de 500 souris sur 5 ans. Les données quantitatives obtenues feront l'objet d'une analyse de variance suivie de tests post-hoc lorsque ce test sera significatif. 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.

8463 L'objectif de ce projet est d'étudier l'altération de la locomotion caractéristique de la sclérose latérale amyotrophique (SLA) associées à des mutations des gènes SMCR8 et C9ORF72. La sclérose latérale amyotrophique (SLA) est une maladie extrêmement invalidante et d'évolution rapide qui est caractérisée par une dégénération des motoneurones de la colonne vertébrale conduisant à une paralysie progressive fatale. Cette maladie est due à une anomalie de l'ADN qui entraîne une mort neuronale, touchant principalement le cortex et les motoneurones de la moelle épinière, qui sont responsables des mouvements. La compréhension de la fonction de ces gènes muté nous permettra de mieux comprendre, voire de traiter, ce type de maladie chez l'homme.

Remplacement :

Pour réaliser ce projet, nous souhaitons utiliser un modèle animal (souris), car aucun modèle *in vitro* ou de culture cellulaire ne nous permet d'étudier les symptômes de perte de la locomotion typiques de cette maladie. De plus, la souris est un modèle de paralysie moteur déjà utilisé et bien étudié, du fait des similitudes avec la pathologie humaine. Le modèle de souris que nous développons présentera la même mutation que les patients humains. En effet, le gène muté humain sera inséré dans le génome de la souris afin de créer une souris transgénique modèle de cette maladie. Nous espérons que ces animaux développeront une paralysie, nous permettant ainsi (1) de comprendre les mécanismes à l'origine de cette maladie, et (2) tester des médicaments afin de trouver une thérapie pour cette maladie.

Raffinement :

Afin de limiter la douleur induite par les symptômes, nous n'étudierons que les premières étapes de l'apparition des symptômes et les animaux seront euthanasiés avant que la phase terminale de la maladie n'apparaisse. De plus, en cas d'observation de la moindre douleur, les souris recevront un

traitement analgésique et anti-inflammatoire, et si cette douleur devait persister, les animaux seraient euthanasiés pour éviter toute souffrance.

Réduction :

Enfin, le nombre d'animaux utilisés est optimisé pour obtenir des résultats statistiques. En effet, des travaux précédents ont permis d'établir les doses de virus à injecter, les temps d'analyses et que l'étude de groupes de 12 animaux permettait d'obtenir des résultats statistiquement significatifs. Ainsi, dans ce projet, nous prévoyons un total de 120 souris réparties en cinq groupes et deux types d'injections (intracérébrales ou intraveineux). Plus en détails, nous prévoyons pour chaque type d'injection 12 souris contrôles, 12 souris avec une expression de SMCR8 normal, 12 souris avec une expression de SMCR8 muté, 12 souris avec une expression de C9ORF72 normal et 12 souris avec une expression de C9ORF72 muté. De plus, un maximum d'analyses sera réalisé sur les cerveaux et la moelle épinière prélevés après la mort des animaux pour éviter des doublons des procédures expérimentales.

8464 Les plaquettes sanguines jouent un rôle essentiel pour arrêter les hémorragies. La transfusion de concentrés plaquettaires est le seul traitement actuellement disponible dans certains cas de déficiences plaquettaires aiguës ou chroniques, héréditaires ou acquises lors des chimiothérapies anticancéreuses par exemple. La production de plaquettes *in vitro*, en vue de pouvoir un jour suppléer au don de sang, en est encore à ces balbutiements et comprendre comment les plaquettes sont formées au sein de la moelle osseuse est clé pour pouvoir comprendre comment traiter les patients accusant une forte diminution de plaquettes (thrombopénie), et à long terme optimiser la production de plaquettes *in vitro*. Les plaquettes sont produites dans la moelle osseuse par des cellules géantes appelées mégacaryocytes. La moelle osseuse est composée essentiellement de cellules en perpétuel renouvellement et migration vers le sang. La moelle étant logée dans l'os qui est rigide, les mégacaryocytes sont de ce fait comprimés par les autres cellules environnantes. Il est maintenant connu que toutes les cellules sentent et réagissent aux forces mécaniques qui les entourent (compression, étirement, rigidité du milieu, flux), dont le champ d'étude est la mécanobiologie. Nous avons récemment montré que la rigidité du milieu de culture et le confinement sont bénéfiques à la formation des mégacaryocytes, et donc des futures plaquettes. Dans ce projet, nous nous intéressons au rôle de certains facteurs permettant aux mégacaryocytes de ressentir ce confinement dû à l'environnement. Ce projet fait appel à l'utilisation de souris dépourvues de 2 facteurs mécanosensibles X et Y, uniquement dans les mégacaryocytes. Le suivi de la numération sanguine est effectué par prélèvement de sang à 4-5 reprises à l'extrémité de la queue de la souris sous anesthésie générale. Ce projet fera appel à 180 souris. Ce projet permettra de comprendre comment certaines voies de signalisation des mégacaryocytes sont impliquées dans la formation des plaquettes *in situ* avec pour objectifs 1) de les cibler chez l'homme pour améliorer le rendement de formation des plaquettes chez les patients thrombopéniques héréditaires ou traités par chimiothérapie ; 2) de recréer en bioréacteur *in vitro* les différentes composantes présentes *in vivo* permettant d'avoir un rendement optimal de production de plaquettes *in vitro*.

Respect de la règle des 3R :

Remplacer : pour le projet scientifique global, certaines expériences utilisant la souris ne peuvent être remplacées par des études *in vitro*, d'une part car ces essais doivent être menés dans un organisme entier afin d'accéder à la complexité des mécanismes, ce qui fait l'objet de notre projet, et d'autre part car la souris est la seule espèce pour laquelle on dispose de modèles dépourvus de ces protéines. A terme, nos résultats visent à recréer *in vitro* un environnement semblable à celui de la moelle osseuse. Nos souris d'intérêt se développent et survivent normalement, et n'ont aucun phénotype dommageable. Les

traitements n'entraînent aucun effet dommageable, hormis une légère anémie avec le traitement 5-FU (< 50%) transitoire (1-2 jours) qui n'affecte pas la vivacité de la souris, mais qui pourrait entraîner une légère hypothermie. De ce fait, on ajoute du coton cardé dans la cage des souris traitées pour favoriser le maintien de leur température, et de la nourriture dans le fond de la cage.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés pour chaque condition est suffisant pour appliquer à l'étude un test d'analyse de variance statistique de type Student pour comparer les différences entre les contrôles et chaque type de souris ko. Les résultats de l'analyse obtenus par ce test statistique

permettront de ne pas répéter l'expérimentation, par conséquent réduire le nombre d'animaux utilisés et aussi les différents facteurs (douleur, souffrance ...) auxquels pourront être soumis les animaux.

Raffiner : Les conditions du travail seront raffinées afin de limiter l'anxiété, l'inconfort, le stress et la douleur associés aux manipulations des souris avant l'anesthésie. Les prélèvements de sang pour suivi cinétique de la de numération plaquettaire se feront sur des souris sous anesthésie isoflurane pour éviter la souffrance mais favoriser un réveil rapide. Dans tous les cas, les souris restent ensemble dans la même cage durant toute l'expérience. Les cages sont enrichies en jouets et coton à déchiqueter pour qu'elles y fassent leur nid, et les animaux sont manipulés avec calme et par des manipulateurs avertis pour limiter le stress de contention, dans l'intérêt du bien-être animal.

8465 Il s'agit d'une étude préliminaire visant à déterminer l'évolution au cours du temps de la concentration d'une enzyme : l'hème oxygénase-1 (HO-1) et des produits résultant de son activation. Cette évaluation sera réalisée après administration hebdomadaire chez le rat mâle adulte par voie intrapéritonéale d'hémine, une protéine qui stimule l'expression de la HO-1.

Les objectifs de cette étude sont d'établir :

1- la dose optimale d'hémine pour induire l'expression de la protéine d'intérêt la HO-1 chez le rat adulte

2- le délai maximum entre les injections d'hémine pour assurer un niveau d'expression de la HO-1 significatif chez le rat

3- la tolérance des animaux au traitement répété par l'hémine

La détermination de ces paramètres permettra de valider la dose hebdomadaire à administrer pour le traitement au long cours d'animaux dans le cadre d'un futur projet de recherche. Des prélèvements sanguins dans la veine jugulaire seront réalisés sous anesthésie à l'isoflurane avant la première injection d'hémine et 3, 7, 14, 21 et 28 jours après cette première injection.

Réduction : trois doses d'hémines seront testées et un lot témoin sera réalisé. En effet, l'expression de la HO-1 peut être modifiée par le stress, il est donc nécessaire de réaliser un lot contrôle. Six animaux seront nécessaires pour chaque lot, soit 24 animaux. Quatre animaux supplémentaires seront inclus afin de permettre au personnel habilité de s'entraîner à la réalisation des gestes techniques (prélèvement de sang à la jugulaire sur animal anesthésié)

Un total de $24 + 4 = 28$ animaux seront nécessaires pour cette étude préliminaire.

La durée de l'étude est évaluée à dix-huit mois.

Raffinement : Les animaux seront hébergés par deux en présence d'un enrichissement comprenant un tunnel en plastique et du papier absorbant.

Remplacement : Cette étude de caractérisation de la cinétique d'induction in vivo de la HO-1 et des produits résultant de son activation après administration hebdomadaire d'un inducteur ne peut être substituée par une méthode alternative in vitro ou sur cellules. Il s'agit de données de pharmacocinétiques qui ne peuvent être collectées qu'à partir d'une étude réalisée in vivo.

8466 La consommation de fer héminique (fer des produits carnés) ou de certains sucres appelés FODMAPS est associée à une formation de composés toxiques dans la lumière colique, composés appelés aldéhydes qui seraient impliqués dans l'effet des viandes sur le cancer et l'effet des FODMAPs sur le syndrome de l'intestin irritable. Le terme FODMAPs regroupe différents sucres non absorbés par l'intestin grêle et fermentés par le microbiote colique. Des travaux précédents ont permis de proposer que le microbiote colique pourrait faciliter la formation de ces aldéhydes lors d'un régime riche en fer héminique. Dans ce projet, nous visons premièrement à démontrer le rôle du microbiote dans la formation des aldéhydes et les effets associés sur la muqueuse lors d'un régime riche en fer héminique ou riche en lactose (50 rats Sprague-Dawley mâles de 5-6 semaines). Deuxièmement ce projet visera à démontrer qu'un probiotique peut limiter la formation des aldéhydes et les effets sur la muqueuse chez des rats préalablement exposés au fer héminique ou lactose (96 rats Sprague-Dawley mâles de 5-6 semaines). Pour prouver le rôle du microbiote nous utiliserons le transfert de flore colique en transférant par gavage la flore de rats exposés au fer héminique ou lactose à des rats

non exposés chez lesquels le microbiote aura été préalablement réduit (par antibiothérapie) pour faciliter l'installation de la flore transférée. Après transfert de flore (gavage unique) ou pour l'expérimentation avec le probiotique distribué par gavage quotidien, nous suivrons les biomarqueurs fécaux et urinaires de formation des aldéhydes chez les rats transférés des groupes fer héminique, lactose et chez les rats traités au probiotique ainsi que la douleur viscérale chez les rats des groupes lactose. Cette expérimentation sera conduite dans le respect de la règle des trois R. Ainsi, le nombre des animaux est réduit au maximum pour toutefois maintenir une puissance statistique suffisante et les conditions expérimentales (anesthésie, points limites et critères d'interruption utilisés ainsi que suivi post-opératoire) éviteront la douleur animale. Un total de 146 animaux sera donc nécessaire. L'utilisation de modèle animal est indispensable car nous travaillons au niveau du côlon où le microbiote joue un rôle très important. Les rats seront hébergés dans des locaux d'animalerie conventionnels, où tout est mis en œuvre pour leur assurer les meilleures conditions de vie et de bien-être (température et environnement contrôlés, cycle jour/nuit correspondant au cycle d'activité des animaux, surveillance et soins quotidiens.).

8467 L'hémophilie est une maladie hémorragique constitutionnelle causée par un déficit en facteur VIII (FVIII) ou en facteur IX (FIX) de la coagulation. La principale complication clinique est l'arthropathie hémophilique, principalement localisée aux genoux, et causée par la répétition des saignements articulaires (hémarthrose) (1-2). Le traitement actuel est basé sur la perfusion de facteur de la coagulation manquant. La prophylaxie par des injections régulières de concentrés de facteur et ayant comme objectif d'améliorer le taux de FVIII/FIX circulant est le seul traitement qui a fait ses preuves pour préserver les articulations et réduire le risque de saignement mettant le pronostic vital en danger. Malgré son efficacité démontrée, la prophylaxie n'est pas encore systématiquement prescrite chez les patients et ceci pour deux raisons essentielles : le coût élevé des facteurs de coagulation et la nécessité d'injections intraveineuses répétées chez des enfants à partir de l'âge de 1 an. Ainsi, l'utilisation de traitements adjuvants qui pourraient améliorer l'efficacité et de permettre d'espacer les injections prophylactiques et/ou de réduire les doses de concentrés de FVIII/FIX administrés présente un intérêt clinique majeur. Dans le cadre d'une étude pilote in vitro, sur des prélèvements sanguins de patients hémophiles, nous avons montré que l'utilisation combinée d'acide tranexamique et de FVIII permet d'améliorer la capacité coagulante des patients et d'obtenir un caillot de fibrine de meilleure qualité, plus stable (3). Cette étude a comme objectif de tester de manière in vivo, chez des souris hémophiles, l'intérêt du traitement combiné et de le comparer à la prophylaxie classique par concentré de FVIII.

Objectifs scientifiques et/ou perspectives d'application médicale :

L'arthropathie est la conséquence d'hémarthroses successives chez le patient hémophile. Le degré d'arthropathie chez un patient hémophile est un des critères principaux permettant de juger de l'efficacité du traitement institué.

Le projet actuel testera comparera l'efficacité de la prophylaxie classique par concentré de FVIII avec celle d'une stratégie combinée FVIII et acide tranexamique. L'acide tranexamique est un anti-fibrinolytique qui permet de protéger le caillot de fibrine formé contre la fibrinolyse, stabilise mieux la caillot et retarde ainsi l'élimination de caillots formés. Il est souvent prescrit pour des saignements mineurs chez les patients ayant des déficits de coagulation. L'acide tranexamique, contrairement aux concentrés de FVIII, a un coût modeste (8 euros les 5 ampoules injectables, contre 2500 euros une dose de FVIII chez un adulte de 70 kg).

Un protocole d'arthropathie hémophilique standardisé a été mis au point chez les souris hémophiles. Le protocole consiste à effectuer un traumatisme sur un genou de souris hémophiles A et B par la ponction à l'aide d'une aiguille. Ce traumatisme entraîne une hémarthrose dans 95% des cas. Par analogie avec la survenue d'une hémarthrose chez le patient hémophile, un traitement antalgique sera effectué pendant au moins 5 jours par un analogue de la morphine. Nous allons utiliser ce modèle pour évaluer l'efficacité des 2 stratégies thérapeutiques contre le risque de saignement articulaire.

Groupe 1 : 10 souris hémophiles A vont recevoir une injection IV unique de concentré de FVIII visant à obtenir un taux circulant de 3% de FVIII

Groupe 2 : 10 souris hémophiles A vont recevoir une injection IV unique de concentré de FVIII visant à obtenir un taux circulant de 3% de FVIII et d'acide tranexamique à la dose de 10mg/kg soit 0.25mg pour des souris de 25g

15 min après l'injection, le genou de la patte arrière droite sera traumatisé selon le protocole établi. Le genou de la patte arrière gauche (non exposé au traumatisme) servira de contrôle normal.

2 jours après le traumatisme, une étude des articulations de genoux sera effectuée à l'aide d'IRM (en coopération avec le CERMEP).

Il est important de préciser que la souris hémophile, paradoxalement à la forme humaine de cette altération génétique, n'est pas victimes de saignement spontané et tout saignement

provoqué sur la souris hémophile est résolutif sans prise en charge particulière.

Afin d'obtenir des résultats les plus fiables possibles, ce projet répond aux mieux aux critères de remplacement, de réduction et de raffinement :

1) Remplacement : la souris est un modèle éprouvé, fiable et de nombreuses lignées hémophiles A et B sont disponibles

2) Réduction : le nombre d'animaux utilisés dans ce projet sera réduit à son minimum sans compromettre la significativité statistique de l'expérimentation

3) Raffinement : toutes les mesures seront prises pour préserver le bien-être de l'animal. Les conditions de l'élevage, de l'hébergement, des soins et des méthodes utilisées pour chaque étape de l'expérimentation se feront sous condition de minimiser douleurs, souffrance, angoisse et dommages durables que pourraient ressentir l'animal.

Les expérimentateurs sont formés aux gestes impliquant un contact avec l'animal et à l'observation des signes cliniques fondamentaux, notamment dans le domaine de la coagulation. Toutes les personnes intervenant dans ce projet auront été préalablement formées à ce genre de protocole.

8468 L'une des étapes indispensables dans l'étude de l'innocuité d'un candidat-médicament consiste en l'analyse de son effet potentiel sur le système cardiovasculaire (pression artérielle, fréquence cardiaque, étude de l'activité électrique du cœur (ECG)). La télémétrie permet de mesurer différents paramètres physiologiques, dont les paramètres cardiovasculaires chez l'animal vigile non contraint en implantant un émetteur de télémétrie sous anesthésie. Cet émetteur permet de mesurer les signaux cardiovasculaires et de les envoyer sous forme d'ondes radios vers un

récepteur. Le signal est ensuite analysé de façon informatique après conversion.

Ce projet consiste à évaluer les effets de différents candidats médicaments sur les paramètres cardiovasculaires chez le miniporc vigile en utilisant la télémétrie.

Pour ce projet, il est prévu un nombre maximal de 120 animaux sur 5 ans.

Règle des 3 R : remplacement, réduction et raffinement

- Remplacement : Dans le cadre du développement de nouveaux médicaments, ce projet est réalisé chez le miniporc car il n'existe pas de méthode de substitution (in vitro ou in silico) pour évaluer les effets d'une nouvelle molécule sur la fonction cardiovasculaire. Or, avant toute administration à l'homme, l'animal constitue un passage obligatoire pour l'évaluation de l'efficacité, la toxicité et la pharmacocinétique d'un candidat médicament. A ce jour, le miniporc est l'une des espèces recommandées pour ce type de modèle d'étude.

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

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

- la mise au point de procédures rigoureuses
- la formation du personnel
- un suivi quotidien de l'état de santé des animaux

- la validation du système de télémétrie et validation pharmacologique du modèle
- le suivi de signes cliniques et des points limites
- le recours aux procédures d'euthanasie dès que nécessaire.
- le suivi post-opératoire de l'état de santé des animaux ainsi que des soins adaptés afin de permettre une bonne récupération des animaux

8469 Le gène ARX (Aristaless-related gene on X chromosome) est impliqué dans différents syndromes ayant une origine neuro-développementale. Comme ce gène est localisé sur le chromosome X, les femmes porteuses de la mutation sur l'un des chromosomes X n'ont pas ou peu de symptômes car le phénotype est sauvé par l'autre gène intact sur l'autre chromosome X. En revanche, les hommes ayant une seule copie mutée du gène ARX sur leur chromosome X vont développer une déficience intellectuelle (DI) parfois accompagnée d'épilepsie et pour les mutations les plus sévères, de malformations cérébrales visibles en IRM (imagerie par résonance magnétique). Afin de mieux comprendre son rôle dans le développement et le fonctionnement cérébral, nous étudions la mutation de ce gène la plus fréquente. Une étude clinique a récemment montré que cette mutation constituait un syndrome clinique bien spécifique, associant DI, spasmes infantiles (une forme particulière d'épilepsie) dans $\approx 10\%$ des cas et des défauts de la motricité fine bien particuliers : les patients montrent des difficultés d'élocution ainsi que pour mâcher et déglutir, et gestuelles caractérisées par une altération de la préhension par la pince (utilisant le pouce et l'index). L'analyse en IRM cérébrale montre que ces patients ont une diminution faible mais significative du volume de certaines structures cérébrales (striatum, hippocampe) et une diminution de l'épaisseur du cortex moteur primaire, qui sont corrélées avec la sévérité du phénotype moteur.

Afin de mieux caractériser l'effet de cette mutation d'ARX, nous avons généré un modèle souris pour cette mutation. Des études de comportement sur les mâles révèlent que ces souris ont, comme les patients, une hyperactivité, des stéréotypies (reproductions involontaires et continues des mêmes mots ou gestes, encore appelés tics) et des défauts d'apprentissage et de mémorisation très spécifiques. Des études préliminaires d'histologie montrent une diminution du nombre de neurones exprimant spécifiquement le neurotransmetteur GABA dans différentes structures cérébrales des souris mutées (cortex, hippocampe, striatum). De plus, les tests de comportement ont montré des défauts de la motricité fine de ces souris avec, en particulier, des problèmes pour attraper une boulette de nourriture ainsi que de coordination motrice des 4 membres. Enfin, une comparaison entre ces souris et une analyse détaillée du tableau clinique de 33 patients français montre une similarité frappante des caractéristiques phénotypiques, suggérant que ces souris sont un bon modèle pour l'étude des conséquences de cette mutation sur le développement et le fonctionnement cérébral.

Nous souhaitons maintenant réaliser des analyses neuro-anatomiques plus détaillées en examinant le cerveau des souris à deux stades embryonnaires (E13.5 et E15.5, c'est-à-dire à 13.5 et 15.5 jours de gestation, le 1er jour correspondant à 0.5), à la naissance et chez l'adulte pour mieux caractériser les anomalies de développement des populations neuronales chez ces souris. En parallèle, des injections en péritonéal de BrdU, un analogue de la thymidine qui est incorporé dans l'ADN au moment de sa réplication et qui sert donc à quantifier les progéniteurs neuronaux, seront réalisées sur des souris gestantes à différents stades embryonnaires (E12.5, E13.5 et E14.5) et les cerveaux des embryons seront récupérés de 2 à 48 heures plus tard. Ces différentes expériences nous permettront d'étudier les principales étapes de développement (prolifération des progéniteurs neuronaux, migration et différenciation neuronales) en focalisant sur les régions cérébrales affectées chez les patients : cortex cérébral, striatum et hippocampe. L'objectif de cette étude est la caractérisation de l'effet de cette mutation d'ARX dans le développement des neurones exprimant le neurotransmetteur GABA afin de mieux comprendre le lien entre ce type de neurones et la déficience intellectuelle et la motricité fine.

Les protocoles de ce projet répondent aux exigences des 3R. Concernant le Remplacement, ce projet ne peut pas être mené in vitro car il n'existe pas de type cellulaire neuronal exprimant ARX et ce gène n'est exprimé que dans le cerveau, ne permettant pas de prélèvements chez les patients et de travaux sur cellules en culture. Cependant, nous prévoyons en parallèle de cette étude de développer des

cellules IPS (cellules souches pluripotentes induites) à partir de cellules sanguines de patients afin de pouvoir étudier certains aspects cellulaires sans avoir à utiliser de nouveaux animaux. Concernant la Réduction du nombre d'animaux utilisés dans cette étude, il sera adapté au plus juste afin de pouvoir garantir une interprétation scientifique et statistique des résultats tout en prenant en compte la variabilité individuelle. Nous prévoyons d'utiliser un maximum de 800 animaux en 3 ans. Concernant le Raffinement, les procédures réalisées sont classifiées de type légers. Le prélèvement caudal pour le génotypage est effectué sous anesthésie locale. Les injections intrapéritonéales, nécessitant une contention maîtrisée, sont réalisées par des concepteurs parfaitement formés à cette technique. Enfin, la mise à mort des embryons et celle de la mère sont conformes aux préconisations de la législation en vigueur. De plus, un suivi quotidien des animaux permet également de s'assurer de leur bien-être tout au long du projet.

8470 Il a été démontré depuis quelques années que la nutrition parentale peut modifier les caractéristiques physiologiques de la descendance et notamment leur métabolisme. Nous avons nourri des mâles et des femelles matures de l'espèce truite arc-en-ciel avec deux aliments : l'un comportant 30% de glucides (HC), l'autre sans glucides (NC). La question centrale de ce projet est de savoir si cette nutrition parentale différentielle modifie le métabolisme basal de la descendance et de discerner l'effet femelle de l'effet mâle. Cette information est essentielle en aquaculture pour voir si une modification du régime parental peut améliorer la croissance des alevins et donc d'une certaine manière la rentabilité de l'élevage. Pour ce faire, à la reproduction nous avons effectué quatre croisements : œufs issus de femelles nourries HC x sperme de mâles nourris NC, œufs issus de femelles nourries HC x sperme de mâles nourris HC, œufs issus de femelles nourries NC x sperme de mâles nourris NC, œufs issus de femelles nourries NC x sperme de mâles nourris HC. Dès le premier repas ces 4 groupes d'alevins seront nourris avec un aliment de type commercial adapté à leur âge. La mesure de la consommation d'oxygène est considérée comme un bon indicateur biologique du métabolisme basal. Cette mesure se fait de manière individuelle dans des chambres métaboliques (petits aquariums individuels immergés dans un même bassin) à l'aide de sonde à oxygène sur environ 15 heures. Il a été démontré précédemment que cet isolement ne stresse pas les poissons qui restent calmes. Pour favoriser leur bien-être la luminosité de la salle est maintenue très faible. Cette mesure sera faite sur 16 poissons par groupe sur 4 jours sur des alevins âgés de 3 semaines après le 1er repas puis sur 32 truites juvéniles de 10g. Durant ces 4 jours les poissons sont stabulés en conditions classiques d'élevage. Pour les alevins, afin de garantir une densité optimale pour le bien-être des animaux, 200 poissons en tout seront utilisés (nombre total d'animaux dans la procédure : 50 poissons par groupe x 4 groupes). Concernant les juvéniles, 128 poissons en tout seront utilisés (nombre total d'animaux dans la procédure : 32 poissons par groupe x 4 groupes). Cette répartition permet de mettre les poissons séquentiellement à jeun 24h avant la mesure de métabolisme (2 poissons analysés par jour) en respectant une densité optimale pour le bien-être des animaux, à savoir 8 par bassin de 70L.

Après l'essai en chambres métaboliques, les 16 poissons par groupe d'alevins ou les 8 juvéniles seront euthanasiés pour effectuer des analyses complémentaires (soit 64 poissons en tout sur les 4 groupes d'alevins et 32 juvéniles en tout pour les 4 groupes) individuelles de biologie moléculaire. Les 34 alevins restant par groupe (soit 136 alevins en tout sur les 4 groupes) seront euthanasiés pour faire des analyses métaboliques complémentaires qui requièrent plus de matériel biologique comme l'analyse des protéines, les alevins ne pesant qu'une centaine de milligramme à ce stade. Les 24 juvéniles restant par groupe (soit 96 poissons en tout) seront donnés au Lycée agricole attenant nos installations pour l'enseignement.

Le nombre total d'animaux utilisé est donc de 328.

Dans le cadre de la règle des 3 R, soulignons que :

- le remplacement n'a pas été possible, les effets physiologiques escomptés (modification du métabolisme basal par l'alimentation des géniteurs) ne peuvent être observés qu'in vivo.
- le raffinement a été respecté car aucun prélèvement ne se fera sur animaux vivants, de plus une faible luminosité est appliquée pour apaiser les alevins. Les mesures d'oxygène se font dans des conditions limitant tout stress : température contrôlée, photopériode avec aube et crépuscule, lumière tamisée. Les mesures seront réalisées pour que le taux d'oxygène dans l'eau ne descende pas en

dessous de 80% de saturation, ce qui ne provoque par expérience aucun stress chez la truite (observable en direct puisque le stress augmente la consommation d'O₂).

- et enfin, la réduction a été un objectif réel, le nombre de poissons prélevés (mise à mort par bain anesthésiant de benzocaïne puis bain euthanasiant) est calculé ad minima compte tenu de la variabilité individuelle observée dans des analyses antérieures.

8471 Le cancer est une maladie complexe qui peut prendre des formes extrêmement variées en fonction des organes et des tissus affectés. Les cellules cancéreuses sont initialement des cellules normales ayant acquis, au cours du temps, un certain nombre de caractéristiques faisant qu'elles ne répondent plus au système de régulation de l'organisme. Celles-ci prolifèrent indéfiniment soit en formant une tumeur maligne et/ou des métastases dans un organe, on parle de tumeurs solides, soit en circulant dans le sang ou la lymphe, on parle de tumeurs liquides tels que les cancers hématologiques (lymphome hodgkinien ou non hodgkinien, leucémie lymphoblastiques ou myéloblastiques...).

Il est donc primordial de développer de nouvelles thérapies innovantes ciblant ces cellules cancéreuses et ces métastases tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Les phases d'étude et de développement des nouveaux composés sont validées dans un premier temps par des tests *in vitro* sur des cellules en culture, mimant artificiellement la pathologie de l'homme. Grâce à ces tests *in vitro*, des molécules actives sont sélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles *in vivo* de souris porteuses de tumeurs afin de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. C'est en effet dans un organisme vivant complet que l'on peut mesurer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse. Les animaux utilisés dans ce projet seront des souris : en oncologie, l'utilisation de la souris est largement décrite dans les publications en recherche préclinique et ces modèles sont davantage déployés chez la souris que chez le rat.

L'objectif de ce projet est de sélectionner le meilleur candidat médicament et de déterminer son indication thérapeutique, dans différents types de cancers « non solides » ou dans des métastases, en monothérapie ou en combinaison avec d'autres molécules pour son développement clinique.

Pour pouvoir effectuer les évaluations *in-vivo*, il est indispensable d'utiliser des modèles tumoraux, maîtrisés et bien caractérisés, en créant des modèles très proches de la pathologie de l'homme. Parmi ces modèles, il en existe deux types : ceux dits « orthotopiques », c'est-à-dire des greffes de cellules implantées directement sur leur lieu d'origine (ex : injection de cellules tumorales hématologiques directement dans le sang) et ceux dits « ectopiques », c'est-à-dire des greffes de cellules implantées en dehors de leur lieu d'origine (ex : injection de cellules de mélanome directement dans le sang) permettant notamment de mimer des métastases expérimentales en court-circuitant les premières étapes du phénomène métastatique (c'est-à-dire la migration dans les tissus entourant la tumeur primaire, puis passage dans les vaisseaux et dans la circulation sanguine).

Les premières études sont dédiées à la sélection du meilleur candidat médicament tandis que les suivantes sont dédiées à la recherche des meilleures modalités de traitement par administration du candidat médicament seul ou en association avec d'autres molécules. La démonstration d'une activité et d'une efficacité anti-tumorale *in-vivo* est nécessaire et primordiale pour développer un candidat médicament.

Les candidats médicaments, doses et schémas de traitement à tester sont déterminées préalablement *in vitro*, puis *in vivo* grâce à des études de Dose Maximale Administrable (DMA) et Dose Maximale Tolérée (DMT) (faisant l'objet d'un autre projet).

Les conditions de greffe des cellules tumorales auront été également, définies au préalable dans les études de mise au point (faisant l'objet d'un autre projet).

Sur la base de ces différentes données, la consultation du service bio-statistiques permet de déterminer le nombre d'animaux à inclure ainsi que consolider le design expérimental (intégrant de nombreux éléments comme l'influence environnementale, la répartition des points de cinétique, l'historique des données du modèle...)

L'efficacité des molécules sera évaluée en priorité par l'évaluation de la régression tumorale ou de la dissémination métastatique via l'imagerie optique (bioluminescent ou fluorescent). L'imagerie optique

est une technique non invasive qui permet de détecter des tumeurs non visibles à l'œil nu et de suivre le développement tumoral au cours du temps sur un même animal (ce qui réduit considérablement le nombre d'animaux inclus/étude). Sa mise en œuvre nécessite cependant l'emploi de cellules modifiées spécifiquement pour émettre fluorescence ou bioluminescence.

Si certaines de ces cellules modifiées n'existent pas sur le marché ou ne sont pas modifiables par nos soins, un suivi en cinétique sera alors envisagé grâce à des prélèvements d'organes et de sang qui seront analysés, en ex-vivo, par des techniques histologiques, biochimiques, immunophénotypiques et/ou moléculaires.

L'état général des souris sera surveillé régulièrement à la fois pour l'objectif de l'étude mais également pour identifier les éventuels signes de souffrance et points limites prédéfinis si nécessaire et en soustraire l'animal au plus tôt.

Tout au long de l'étude, les souris sont hébergées en groupes sociaux et un enrichissement de milieu, sous forme de « cocoon », sera apporté de manière à favoriser leur instinct de nidification. Cet enrichissement permettra également de surveiller leur état général par observation de leur comportement vis-à-vis de cet enrichissement.

Dans la mesure du possible, nous concentrerons nos études sur les procédures faisant appel à l'imagerie optique (pour réduire le nombre d'animaux) avec au final 16 études de 110 souris sur 5 ans, soit 1760 souris au total.

A défaut, d'une utilisation possible de l'imagerie des études de suivi en cinétique seront réalisées. Elles seront beaucoup moins développées et ne devraient nécessiter que 2 études de 150 souris sur 5 ans, soit 300 souris au total. Soit pour l'ensemble du projet, 2060 souris.

8472 12 millions de personnes dans le monde souffrent d'un désordre moteur appelé spasticité. Il s'agit de contractions exagérées d'un muscle entraînant des troubles des mouvements et/ou de la posture qui peuvent être chroniques et douloureux. Ainsi tout mouvement locomoteur devient difficile voire impossible ; les conséquences en sont très invalidantes et peuvent aller jusqu'à la mise en danger de la vie des personnes. La spasticité est présente au cours de nombreuses maladies neurologiques telles que l'accident vasculaire cérébral, la sclérose en plaques, la lésion de la moelle épinière ou le traumatisme crânien. Sa prise en charge médicale repose sur des traitements dont l'objectif est soit de provoquer la relaxation musculaire, soit d'empêcher la stimulation du muscle par le nerf. Ainsi, les médecins utilisent les myorelaxants comme le baclofène ou le dantrolène mais leur niveau d'efficacité reste faible. Les patients peuvent aussi être pris en charge par l'utilisation de la toxine botulique. Ce traitement est efficace mais n'agit qu'après quelques jours et doit être renouvelé régulièrement. Des recherches sont donc faites pour améliorer l'efficacité, la puissance, la rapidité et la durée d'action de ces traitements. Après une évaluation in vitro des nouvelles molécules, les plus prometteuses sont testées, dans ce projet, chez le rat afin de valider leur efficacité et leur sécurité d'utilisation.

Ce projet a pour objectif d'étudier l'effet de diverses molécules sur l'activité musculaire en utilisant 3 différentes méthodes complémentaires, largement décrites et utilisées : quantification de l'écartement spontané des doigts, la répartition du poids de l'animal sur ses pattes lors de ses déplacements libres et l'activité électrique musculaire selon une méthode proche de celle utilisée chez l'homme.

Dans le cadre du respect de la règle des 3R, aucune méthode de remplacement n'est disponible pour étudier la problématique du présent projet. La myorelaxation est un phénomène complexe qui met en jeu plusieurs acteurs et différents processus de contrôle. Nous portons une attention particulière au raffinement des conditions d'hébergement (enrichissement du milieu avec des bâtons à ronger (« aspen bricks ») et des tunnels afin que les animaux puissent se cacher, soin aux animaux) et d'expérimentation (travail sous anesthésie gazeuse, méthode de manipulations adaptées, nombre et durée des tests optimisés), afin d'assurer à nos animaux des conditions de vie les meilleurs possibles. De plus nous cherchons toujours un compromis expérimental qui permet de réduire le nombre d'animaux utilisés. En nous basant sur les données historiques obtenues avec les différents tests réalisés, le nombre d'animaux par groupe a été fixé à 7. Une étude comporte généralement 1 groupe contrôle, 3 groupes traités par des doses différentes du produit à tester. Un nombre de 560 rats est prévu pour ce projet sur une période de 5 ans.

8473 Les agnelets nés des troupeaux laitiers sont nourris par leur mère jusqu'au début de la traite et sont ensuite sevrés et collectés par des groupements ovins ou des éleveurs indépendants. Ces agneaux se retrouvent alors en ateliers d'engraissement et sont élevés pendant 2 à 3 mois jusqu'à atteindre un poids d'environ 35 kg au moment de l'abattage.

Le système d'élevage intensif spécifique à la filière de production des agneaux sevrés favorise le développement des maladies infectieuses, notamment des pathologies respiratoires, causes principales de mortalité dans les bergeries et de saisie en abattoirs. Pour prévenir l'apparition et la propagation de ces pathologies, les animaux reçoivent un traitement antibiotique préventif via l'alimentation pendant les phases de démarrage et de croissance (20 premiers jours d'engraissement).

Cette pratique est remise en question avec le plan national de réduction des risques d'antibiorésistance en médecine vétérinaire (Ecoantibio). Ce plan préconise que seules les quantités d'antibiotiques appropriées et strictement nécessaires doivent être prescrites et administrées aux agneaux.

Il est déjà possible de traiter les agneaux individuellement avec des formulations antibiotiques injectables. Cependant, s'il faut traiter un grand nombre d'agneaux plusieurs fois par jour, le traitement individuel injectable devient difficile à mettre en place et coûteux pour l'éleveur. Une alternative pourrait être l'administration d'antibiotiques par voie orale via l'eau de boisson, ce qui permettrait un traitement rapide sans obligatoirement traiter tous les agneaux d'un bâtiment d'élevage (possibilité de cibler une seule des loges comme la loge infirmerie par exemple).

Le but de ce projet est de déterminer si l'administration d'antibiotiques via l'eau de boisson permet d'atteindre des concentrations plasmatiques en antibiotiques suffisantes chez la majorité des agneaux pour traiter les pathologies respiratoires présentes en atelier d'engraissement ovin. Au cours d'un projet précédent celui décrit ici, des antibiotiques (dont la solubilité dans l'eau a été vérifiée au préalable) seront administrés par voie orale et par voie intraveineuse à un petit groupe d'agneaux afin de déterminer leurs paramètres pharmacocinétiques. L'obtention de ces paramètres permettra de choisir les modalités de traitement à mettre en place en atelier d'engraissement dans ce projet (dose à administrer, nécessité de doubler la dose au premier jour de traitement ou non, fractionnement de la dose sur 12h ou sur 24h, durée du traitement).

Chaque traitement antibiotique testé sera administré via l'eau de boisson à une loge de 100 agneaux (densité minimale observée en élevage) soit 500 agneaux au total.

Les 100 agneaux/antibiotique seront répartis en deux lots de 50 agneaux comportant chacun 25 mâles et 25 femelles. Les agneaux de chaque lot seront prélevés 1 jour sur deux pendant les jours de traitement (4 ou 5 jours en général) et entre 2 et 3 jours après le dernier jour de traitement en fonction du temps de demi-vie de l'antibiotique. Au final, pour un traitement antibiotique de 5 jours avec un antibiotique au temps de demi-vie long, chaque agneau pourra être prélevé au maximum 4 fois avec un lot de 50 agneaux prélevé au 1er, au 3ème et au 5ème jour de traitement et 2 jours après l'arrêt du traitement, et un lot de 50 agneaux prélevé au 2ème et au 4ème jour de traitement, et 1 jour et 3 jours après l'arrêt du traitement.

Cinquante agneaux seront prélevés par temps de prélèvement car une grande variabilité interindividuelle est attendue compte-tenu du fait que les agneaux proviennent d'élevage différents, n'ont pas tous le même poids, ne boivent pas tous les mêmes quantité d'eau contenant les antibiotiques au même moment, n'ont pas tous le même statut sanitaire, etc.

Les expérimentations seront réalisées directement en atelier d'engraissement. La contention des animaux ainsi que les prélèvements seront réalisés par du personnel formé à la manipulation des animaux en élevage (pas de tonte de la jugulaire, animaux peu habitués aux prises de sang) pour éviter tout stress ou douleur à l'animal. Les animaux ne seront jamais isolés pour éviter un stress de séparation du groupe.

8474 L'importance des interactions entre un hôte et son microbiote intestinal est connue de longue date. Ce champ d'investigation a connu ces dernières années des avancées sans précédent, notamment chez les animaux d'élevage, car le microbiote intestinal est au carrefour de fonctions physiologiques majeures sous-jacentes à de nombreux caractères d'intérêt (santé et immunité, croissance, efficacité

alimentaire, bien-être, etc.). L'identification de leviers permettant d'orienter les microbiotes des animaux d'élevage offre des perspectives originales et extrêmement intéressantes pour mieux utiliser des ressources alimentaires plus variées, réduire les rejets, diminuer l'usage des antibiotiques, améliorer la santé et le bien-être animal, et contribuer ainsi à améliorer la durabilité de l'élevage.

Le tube digestif, stérile in utero, est colonisé après la naissance par des espèces microbiennes qui se diversifient progressivement pour s'organiser en un écosystème qui reste relativement stable au cours de la vie. Comprendre comment se façonne le microbiote d'un individu est capital pour savoir ensuite comment le moduler. L'environnement de naissance et l'alimentation sont connus comme des déterminants importants. La génétique de l'hôte joue également un rôle, mais son étude reste complexe car le microbiote est à la fois un phénotype et un environnement pour son hôte. Le microbiote est en effet un écosystème dynamique qui va co-évoluer avec son hôte. De plus, la plupart des études réalisées jusqu'à présent n'ont pas permis de dissocier de façon rigoureuse la variabilité liée à la génétique de l'hôte des effets génétiques et environnementaux liés à la transmission du microbiote maternel à la naissance. Une démonstration formelle des possibilités d'évolution hôte/microbiote par sélection directionnelle sur plusieurs générations est nécessaire pour avancer sur ces questions.

Le projet vise, grâce à la mise en œuvre d'une sélection directionnelle sur la composition du microbiote, à mieux comprendre son déterminisme génétique et ses modalités de transmission pour, à terme, proposer cette voie pour l'amélioration en élevage de la santé et du bien-être des porcs. L'expérimentation sera conduite sur 600 porcs de race Large White, répartis en deux générations successives, avec une étape de sélection des reproducteurs. L'estimation de la réponse à la sélection permettra d'affiner nos connaissances sur les interactions entre l'hôte et son microbiote et sur leur co-évolution.

Le projet a été élaboré dans le respect de la règle des 3R. Remplacement : les mesures sur le porc sont requises car il s'agit de l'espèce cible. L'objectif est d'explorer le déterminisme génétique de la composition du microbiote à des fins de sélection, notamment pour améliorer la santé et le bien-être des animaux. Réduction : le nombre d'animaux du protocole a été calibré afin de disposer du nombre minimum d'échantillons pour permettre l'estimation des paramètres génétiques et de valider la réponse à la sélection dans le cadre d'une sélection directionnelle. Raffinement : les méthodes de prélèvements employées sont peu ou pas invasives et sont mises en œuvre par un personnel expérimenté de façon à limiter le temps d'intervention et le stress des animaux.

8475 La glycogénose de type I est une maladie génétique rare caractérisée par une incapacité de l'organisme à produire du glucose (sucre) pour maintenir sa glycémie (taux de sucre dans le sang) entre 2 repas. La maladie se caractérise par des hypoglycémies sévères, rapidement après un repas. A l'âge adulte, la plupart des patients développent une maladie rénale. La maladie rénale est d'abord silencieuse puis peut être mise en évidence par la présence d'albumine dans les urines (microalbuminurie). En progressant lentement, mais irréversiblement, elle évolue vers une insuffisance rénale. A l'exception d'un contrôle nutritionnel très strict limitant les hypoglycémies, il n'existe actuellement aucun traitement curatif pour limiter l'avancée de la maladie rénale. La dialyse puis la transplantation rénale sont les seules solutions lorsque l'insuffisance rénale est atteinte.

Le développement de cette maladie a été reproduit chez la souris en ciblant la mutation génétique de la glycogénose de type I uniquement dans les reins. Comme chez l'homme, l'évolution de la maladie rénale est lente et silencieuse mais irréversible et mène à une insuffisance rénale au bout de 15 mois environ. Les premiers signes cliniques (microalbuminurie) apparaissent entre 6 et 9 mois, mais en l'absence d'épisodes d'hypoglycémie car le foie peut produire du glucose. Le but de ce projet est de réduire le temps de développement de la maladie rénale en enlevant un rein (néphrectomie unilatérale). Ce modèle animal de maladie rénale « accélérée » permettra de tester des approches thérapeutiques en réduisant les temps d'analyse. L'apparition de la maladie rénale sera suivie avec un contrôle régulier de marqueurs biologiques dans le sang et les urines, jusqu'à l'apparition de l'insuffisance rénale. Des premiers essais de thérapie génique ciblant le rein seront aussi réalisés pour déterminer l'efficacité de vecteurs recombinants pour délivrer le gène manquant dans les cellules rénales.

Cette étude sera réalisée en respectant la règle des 3R :

Remplacement : L'étude de la pathologie rénale et les tests thérapeutiques sont difficiles à réaliser chez l'homme car le nombre de patients est très limité (1 naissance sur 100 000) et la pathologie est progressive et évolue sur plusieurs années. Il est donc nécessaire de démontrer l'efficacité des traitements chez les souris atteintes de glycogénose de type I. Aucune approche en culture cellulaire ne permet d'apprécier l'efficacité du traitement sur la maladie rénale.

Réduction : Le nombre total d'animaux a été calculé au plus juste à partir de nos connaissances sur l'évolution de la pathologie dans ce modèle animal. Des groupes de 8 à 10 souris maximum seront étudiés (injection de différents vecteurs optimisés) pour réaliser ensuite des analyses statistiques. Au total, ce projet nécessitera au maximum 450 souris sur une période de 5 ans.

Dans un souci de raffinement des méthodes, les animaux seront élevés par groupe dans un environnement enrichi pour favoriser la nidation. Ils seront suivis quotidiennement et pesés régulièrement. Les premiers signes de la maladie rénale (microalbuminurie) sont sans conséquence sur le bien-être animal (maladie silencieuse). L'apparition d'une insuffisance rénale est plus tardive (taux importants d'urée dans le sang) et s'accompagne en général d'une perte de poids importante. La bonne connaissance du modèle animal a permis de définir des points limites. Le suivi du poids des souris et des marqueurs biologiques permettra de connaître régulièrement le stade d'évolution de la maladie des souris, à partir d'un prélèvement de sang et d'urine. La chirurgie sera réalisée dans des conditions d'asepsie, sous anesthésie générale, avec une prise en charge de la douleur pré et post-opératoire. Les souris seront mises à mort à la fin du protocole ou plus précocement en cas d'atteinte de points limites, selon les méthodes autorisées par la législation afin d'analyser les reins.

En conclusion, l'obtention d'un modèle animal de glycogénose de type I développant la maladie rénale plus précocement et plus rapidement devraient permettre de tester l'efficacité de médicaments ou approches thérapeutiques comme la thérapie génique de façon plus efficace.

8476 En Europe comme aux Etats-Unis, le cancer est actuellement la seconde cause de mortalité derrière les maladies cardiovasculaires. En France, cette pathologie provoque environ 33 % des décès chez les hommes et 23 % chez les femmes. Il est donc primordial de s'intéresser à cette maladie et de trouver de nouvelles thérapies.

Un enjeu majeur pour la recherche consiste donc à trouver de nouvelles thérapies ciblant spécifiquement les cellules cancéreuses tout en limitant les effets secondaires sur l'organisme.

Pour tester l'activité de nouveaux composés, des tests in-vitro sont systématiquement mis en place sur des cellules en culture.

Grâce à ces tests in vitro, seules les molécules présentant une activité sont présélectionnées avant d'être testées, en seconde intention, dans des modèles dits in vivo de souris porteuses de tumeurs qui vont permettre de démontrer leur activité et leur efficacité anti-tumorale. Ces modèles in vivo sont indispensables car c'est dans un organisme vivant complet que l'on peut évaluer les effets pharmacologiques d'une molécule anti-cancéreuse.

Afin de permettre la greffe et la prolifération de cellules cancéreuses d'origine humaine dans l'organisme de la souris, il est nécessaire qu'elle n'ait plus de système immunitaire afin d'éviter que ce dernier induise une réaction de rejet en détruisant le greffon.

L'irradiation des animaux est une technique couramment utilisée, depuis de nombreuses années, dans les laboratoires de recherche afin de détruire, de façon temporaire ou permanente selon les conditions techniques, le système immunitaire des souris. Et même si de nombreuses souches de souris spontanément immunodéprimées existent, leur immunodéficiência n'est pas totale, et peut nécessiter de recourir à une irradiation préalable des animaux pour la réduire davantage.

L'objectif de ce projet, situé en amont de nos projets de recherche de thérapies candidates, est de mettre au point les conditions expérimentales de l'irradiation pour obtenir une réduction temporaire du système immunitaire des souris tout en préservant leur bon état général. L'irradiation préalable des souris doit permettre :

1) d'homogénéiser et optimiser la prise de greffe de cellules tumorales humaines ou murines pour les études de pharmacologie et ainsi contribuer à la réduction globale de la quantité d'animaux dans l'activité de recherche de thérapies candidates globale.

2) d'optimiser les humanisations, (méthode qui consiste à « remplacer » le système immunitaire de la souris par greffe de cellules immunitaires humaines afin ensuite d'évaluer l'activité anti-tumorale de composés et leurs interactions avec cet environnement immunitaire humain). La réduction du système immunitaire de la souris par une irradiation va ainsi permettre la prise de greffe et la reconstitution d'un système hématolymphoïde humain parfaitement fonctionnel.

Avant tout démarrage des études de ce projet, une phase de recherche bibliographique permettra de sélectionner les doses à valider, spécifiquement pour chaque souche de souris évaluée. Afin de limiter au maximum les risques et le nombre d'animaux utilisés, une collaboration avec le service biostatistiques a permis de définir une approche progressive dans laquelle ces doses d'irradiation seront testées par pallier et sur de très petits nombres d'animaux. Les paramètres sanguins des animaux seront suivis au cours du temps.

Le système immunitaire des souris se trouvant complètement déficitaire en conséquence de l'irradiation, les souris seront logées et manipulées dans un secteur à confinement spécifique afin de les protéger de tout risque de contamination.

Les souris irradiées feront l'objet d'une surveillance accrue. L'état général des souris sera très fortement surveillé, grâce à une grille de scoring biquotidien permettant de déterminer l'état des animaux tout au long de l'étude et d'identifier tout signe de souffrance ou de dégradation de l'état général. Les points limites prédéfinis seront mis en application si nécessaire.

Tout au long de l'étude, les souris seront logées en groupes sociaux dans la mesure du possible et un enrichissement de milieu, sous forme de tubes de coton à décortiquer sera apporté afin de favoriser leur instinct de nidification. D'autre part, des précautions particulières à l'hébergement de ces animaux fragilisés seront mises en place telles que compléments alimentaires, accès facilité à l'eau, etc...

Compte tenu du nombre de doses et de souches murines à étudier, nous estimons à 40 le nombre de souris nécessaires par souche pour ce projet sur une période de 5 ans (soit 400 animaux au total).

8477 Selon l'OMS, en 2017, les maladies infectieuses sont responsables dans le monde de 17 millions de décès par an, soit un tiers de la mortalité et 43 % des décès dans les pays en voie de développement (contre 1 % dans les pays industrialisés).

Les maladies infectieuses recouvrent un large spectre de pathologies bénignes comme le rhume ou l'angine, mais également très graves comme l'infection par le virus de l'immunodéficience humaine, les hépatites, le paludisme ou la tuberculose. Si la recherche a permis l'éradication de certaines d'entre elles grâce à la mise au point de vaccins spécifiques et des antibiotiques, il reste encore beaucoup de chemin à parcourir pour que toutes ces pathologies soient traitées.

Dans le cas du développement d'un vaccin anti-infectieux, il convient de s'assurer que le candidat vaccinal permet d'induire une réaction immunitaire spécifique chez l'animal sain après injection, permettant le développement d'anticorps spécifiques contre la pathologie visée, avant la réalisation d'études d'efficacité (challenge vaccinal). Il n'existe pas de méthode alternative à l'heure actuelle permettant de modéliser de manière fiable l'immunogénicité d'un produit injecté dans un organisme vivant. Le recours à l'expérimentation animale est donc nécessaire à l'objectif de ce projet.

Ce projet a pour objectif de caractériser l'immunogénicité de candidats vaccinaux après administration chez la souris, le rat, le hamster, le cobaye, la gerbille, le lapin ou le furet.

En fonction des espèces et des candidats vaccinaux, un nombre différent d'animaux par groupe et par étude sera prévu :

- Souris : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Rat : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Hamster : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Gerbille : 900 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 90 individus par étude, avec 6 groupes de 15 individus, et 10 études au cours des 5 années.

- Cobaye : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années
- Lapin : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années.
- Furet : 600 individus au total sont prévus dans ce projet, ce qui correspond à 60 individus par étude, avec 6 groupes de 10 individus, et 10 études au cours des 5 années.

Pour un total de 5400 animaux en tout.

Dans la mesure du possible, les animaux seront hébergés en groupes en cage ou en enclos pour une plus grande liberté de mouvement et pour favoriser leur comportement naturel exploratoire et social.

Des points limites ont été définis afin de préserver le bien-être des animaux. Un suivi quotidien des animaux sera réalisé afin de détecter tout signe clinique anormal.

Des méthodes permettant de prévenir l'apparition de ces points limites et des soins seront apportés aux animaux lorsque nécessaire (désinfections des plaies, réchauffement, réhydratation, etc.).

Ce projet permettra de sélectionner de nouveaux candidats vaccins à visée anti-infectieuse pour les phases d'efficacité, et à terme, pour la mise sur le marché de nouveaux vaccins.

8478 Les maladies cardiovasculaires sont la première cause de mortalité dans le monde. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé, elles sont à l'origine de 30% de la mortalité mondiale totale. L'institut de veille sanitaire indique qu'en 2008, l'insuffisance cardiaque a causé 22 000 décès et 200 000 séjours hospitaliers en France. Les cardiomyopathies hypertrophiques héréditaires (d'origine génétique) ou non génétique présentent des pathologies qui, à long terme mènent à la mise en place et la progression de l'insuffisance cardiaque. Les mécanismes physiopathologiques impliqués dans ce contexte sont encore mal pris en charge par les traitements actuels et nécessitent donc la mise au point de nouvelles approches thérapeutiques.

Cette situation clinique peut être étudiée au laboratoire grâce aux modèles précliniques chez l'animal et ainsi permettre la découverte de nouvelles thérapies.

L'objectif de ce projet est de mettre en place dans notre laboratoire un modèle court et rapide à mettre en place de dysfonction cardiaque chez le rat induit par administration/infusion de l'isoprotérénol en complément des modèles dont nous disposons déjà. L'administration de l'isoprotérénol (un composé chimique utilisé en médecine humaine qui va agir et améliorer la fréquence et la contractilité du muscle cardiaque chez les patients en urgence présentant une forte altération de la contractilité du cœur) et la mise en place d'une dysfonction cardiaque chez le rat et la souris a été largement décrite dans la littérature. En effet il a été démontré que l'isoproterenol entraîne dans les deux jours qui suivent son administration/infusion une nécrose des cardiomyocytes (cellules musculaires du cœur) suivie par la mise en place d'une hypertrophie cardiaque importante au bout de 15 jours d'administration quotidienne. Ce remodelage cardiaque consécutif à l'administration de l'isoprotérénol va avoir pour conséquence fonctionnelle la mise en place d'une dysfonction cardiaque systolique qui peut progresser et mener à plus long terme (quelques semaines) à une insuffisance cardiaque.

Ce projet comporte deux phases, la première va consister en la mise en place des conditions expérimentales (basées sur la littérature) et validation du modèle par des médicaments de référence, la seconde permettra d'évaluer l'efficacité de candidats médicaments et leurs propriétés curatives ou préventives sur l'hypertrophie et ses effets à court terme ou l'insuffisance cardiaque à plus long terme.

L'infusion de l'isoprotérénol pourra être réalisée grâce à une pompe osmotique, installée sous la peau par une intervention chirurgicale simple et sous anesthésie générale, ou par injections quotidiennes.

L'état général des rats sera surveillé en post-opératoire d'une part pour s'assurer qu'ils ont bien récupéré leur état de santé (sutures, masse corporelle, activité locomotrice...), puis d'autre part tout au long de l'installation de l'insuffisance cardiaque afin d'identifier au plus tôt la survenue de ses symptômes caractéristiques (perte d'appétit, apathie, dyspnée). Un suivi par télémetrie des paramètres de température, fréquence cardiaque ou encore activité locomotrice (via l'implantation d'un émetteur par chirurgie préalable aux études et réalisée également sous anesthésie générale) va permettre de compléter la surveillance et d'évaluer les effets de l'administration de l'agent

isoprotérénol en temps réel et tout au long des premières phases de mise en place du modèle. L'intérêt majeur de la téléométrie étant de permettre des mesures en continu et à distance sans perturber l'animal maintenu dans son environnement habituel. En cas de constatation d'un signe de souffrance, les animaux seront retirés de l'étude en fonction de points limites prédéfinis.

La dysfonction ventriculaire est mesurée au moyen d'imagerie clinique (échographie) en cours d'étude, ou de mesures hémodynamiques (pression intraventriculaire gauche, pression artérielle, fréquence cardiaque) sous anesthésie générale en fin d'étude. Des évaluations anatomiques, ex-vivo et in-vitro sont également réalisées en fin d'étude sur les organes/sang prélevés au moment de la mise à mort de l'animal.

Les rats seront placés en cages individuelles avec nourriture et eau à volonté, enrichies de cubes de bois à ronger.

Ce projet prévoit l'utilisation de 1800 rats sur une durée totale de 5 ans.

8479 La pollution environnementale liée aux polluants organiques persistants (POP) et ses conséquences en termes de transfert potentiel dans la chaîne alimentaire est une problématique qui prend de l'ampleur dans nos sociétés. Les POP sont des composés chimiques généralement stables et difficilement destructibles. Ils sont à l'origine de nuisances potentielles sur les écosystèmes et la santé des organismes vivants (perturbateurs endocriniens, neurotoxicité...). Les polluants organiques tels que les Polychlorobiphényles (PCB) et le Chlordécone (CLD) ont impacté significativement certains sols agricoles dans les régions accidentellement ou historiquement contaminées. Ces molécules ont été interdites en France depuis des décennies mais elles sont encore présentes dans les sols pour plusieurs dizaines voire plusieurs centaines d'années. La question qui se pose est celle du maintien de l'élevage dans les zones contaminées. En effet, les animaux peuvent ingérer involontairement des quantités non négligeables de sol, et par ce biais les contaminants peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire et in fine contaminer l'homme via son alimentation. Afin de préserver la santé des consommateurs et de sécuriser les denrées alimentaires, l'Union Européenne a fixé des valeurs limites de résidus dans les aliments (Règlements CE N° 839/2008, Règlement UE N°1259/2011). Les plans de surveillance mis en place ont permis d'identifier un nombre significatif de ruminants dont les teneurs en polluants dépassaient les LMR et donc impropres à la consommation.

La chlordécone est connue pour être métabolisée en chlordécol chez certaines espèces. Une étude a mis en évidence l'apparition de ce métabolite chez la brebis, cependant, même si la littérature rapporte une réversibilité possible de cette transformation d'une cétone en alcool, aucune donnée n'existe chez la brebis permettant de mettre en évidence cette réaction ni de la quantifier. Evaluer si cette réaction a lieu, permettrait d'apporter des éléments explicatifs pour mieux interpréter les données sériques et fécales de toxicocinétiques existantes chez la brebis et donc de comprendre les mécanismes du devenir de la molécule mère. Six brebis permettront de compléter ces données. Pour cela du chlordécol sera administré (par intraveineuse à la veine jugulaire) sur ces animaux et des prélèvements de sang, d'urine, de fèces, de tissus et de contenus digestifs seront effectués dans les 3 jours suivant l'injection (à 24 et 72h). Une mise à mort via l'utilisation d'une tige perforante (matador) suivie d'une exsanguination immédiate sera donc effectuée sur 3 brebis à 24 et sur 3 brebis à 72h.

Le prélèvement de tissus permettra également de vérifier la présence ou non du chlordécol et/ou de la chlordécone dans ces derniers. En effet, le chlordécol peut être ingéré par l'animal via l'ingestion de matrices environnementales dans lesquelles sa présence a été récemment démontrée (eau, sol et plante).

Remplacement : pour obtenir ces informations, aucun remplacement n'est envisageable pour ce type d'étude, mais les données collectées pourront servir à la construction d'un modèle compartimental de transfert de la CLD à l'échelle de l'animal.

Réduction : Le nombre d'animaux sera limité au maximum pour des raisons d'éthique. Un nombre de répétitions de 3 apparaît cependant nécessaire et suffisant pour l'étude de la réversibilité du chlordécol en chlordécone, pour s'assurer de la puissance statistique nécessaire (sur la base de l'expérience antérieure de l'équipe de recherche en terme d'écart-type résiduels prévisibles pour les petits ruminants et la sensibilité analytique du dosage de la chlordécone et de son métabolite).

Raffinement ; Les animaux seront placés en logement collectif conformément à la réglementation, sauf lors de la pose d'un cathéter et lors des prélèvements de fèces où les brebis seront en boxes individuels sur des périodes de maximum 24h. Cependant afin d'assurer un maximum de bien-être aux animaux, les contacts visuel, auditif et olfactif seront préservés. De même des éléments d'enrichissement du milieu seront ajoutés dans les boxes collectifs.

Points limites : Compte-tenu des interventions envisagées une surveillance régulière est suffisante. Lors de celles-ci, des comportements d'inconfort (prostration, refus de nourriture, vocalisation) seront relevés. Par ailleurs, une évaluation de la douleur sera réalisée quotidiennement sur le comportement de l'animal. On considèrera que toute chute de poids de plus de 15% entre deux pesées (une pesée ayant lieu une à deux fois par semaine) impliquera un protocole de soin ou une mise à mort en cas d'abattement profond. Afin de limiter toute angoisse liée à la claustration en cage individuelle, les contacts visuels, auditifs et olfactifs entre les individus seront conservés.

8480 L'oxyhydroxide d'aluminium (alum), un composé nano-cristallin formant des agglomérats, est utilisé pour ses propriétés d'adjuvant vaccinal depuis 1927. Il demeure très utilisé, mais les mécanismes par lesquels il stimule la réponse immune sont encore largement incompris. Généralement bien toléré, l'alum pourrait cependant être à l'origine de troubles chroniques occasionnels chez des sujets prédisposés. En effet de rares sujets vaccinés présentent des myalgies retardées et diffuses, un état d'épuisement chronique et des troubles cognitifs invalidants. Ces symptômes, associés à la présence d'un granulome chargé en particules d'aluminium au niveau du site d'une immunisation préalable avec un vaccin adjuvanté en hydroxyde d'aluminium, permettent de diagnostiquer une condition pathologique décrite au laboratoire comme la Myofasciite à Macrophages (MFM).

Des expériences réalisées chez la souris indiquent que des particules bio-persistantes, telles que des nano-hybrides aluminiques fluorescents, injectées dans le muscle sont en partie transportées à distance par des cellules de la lignée monocytaire, d'abord vers les ganglions lymphatiques de drainage puis, via le canal thoracique, vers la circulation sanguine, avec une accumulation retardée et progressive dans le cerveau, où on les détecte dans les cellules microgliales. Quoique constante, la pénétration cérébrale reste extrêmement faible en conditions normales, ce qui est cohérent avec la bonne tolérance générale à cet adjuvant malgré son fort potentiel neurotoxique.

Le présent projet vise à déterminer, chez la souris adulte, les éventuels effets neurotoxiques de l'aluminium, par l'évaluation du comportement des animaux injectés, à différents temps après les injections. Dans le but de relier les résultats comportementaux à une étude anatomopathologique des tissus d'intérêt, et dans la mesure où l'aluminium à l'état trace est difficilement repérable dans les tissus, un complexe mettant à profit les propriétés de marqueur des nanodiamants a été élaboré à partir de l'adjuvant vaccinal. La mise au point de la fabrication du complexe utilisé a été faite in vitro de manière à limiter l'utilisation des animaux à l'étude en situation vaccinale. Le projet nécessitera l'utilisation de 10 souris par groupe afin de permettre une analyse fiable des données obtenues, pour un total de 24 groupes différents, soit 240 animaux.

Les principes de remplacement, réduction et raffinement ont été pris en compte pour construire les protocoles expérimentaux de ce projet. L'étude de la distribution systémique d'un agent pharmacologique et de ses effets sur le comportement ne peut s'effectuer que sur les organismes entiers et ne peut donc être substitué par une étude in vitro. La souche de souris CD1 a été sélectionnée pour sa pertinence compte tenu des données de la littérature disponibles sur cette thématique. Le nombre d'injections sera réduit au minimum pour le bien-être des animaux et des points limites ont été intégrés au protocole pour limiter le stress et la souffrance des animaux. La vaccination des souris ne génère a priori pas d'effets dommageables évidents, ceux-ci pouvant être comparés à ceux occasionnés chez l'Homme, à savoir un éventuel état fébrile temporaire. Le milieu sera enrichi par l'apport de matériel pour construire un nid, et l'hébergement sera assuré en groupe pour permettre aux animaux d'exprimer un comportement social naturel. Les animaux seront suivis quotidiennement afin de suivre leur bien-être.

8481 Ce projet de recherche translationnelle vise à comparer les performances de la Tomographie par Emission de Positons (TEP) au 18F-FDG et l'imagerie tomographique de fluorescence (dirigée contre

les intégrines) dans un modèle de cancérogenèse : l'adénocarcinome pancréatique murin. La réalisation de ce projet se fera sur une durée maximale de deux ans.

En cancérologie expérimentale, la mise en œuvre de l'imagerie bio photonique in vivo (bioluminescence et fluorescence) a considérablement simplifié l'étude de la prolifération/dissémination tumorale dans les modèles de xénotransplantes avec des cellules tumorales exprimant un gène rapporteur. L'exploitation de l'imagerie in vivo dans les études de cancérogenèse spontanées reste par contre beaucoup plus complexe lorsque l'objectif vise à détecter des tumeurs à un stade très précoce et dans un territoire anatomique d'exploration difficile tel que l'abdomen. Seule l'imagerie moléculaire est envisageable pour une détection précoce et nécessite la mise en œuvre d'un biomarqueur spécifique du processus tumoral mais utilisable pour une grande variété de tumeurs. L'objectif de ce projet vise à comparer les performances de l'imagerie TEP (méthode de référence) et l'imagerie tomographique de fluorescence (dirigée contre les intégrines) dans un modèle de cancérogenèse : l'adénocarcinome pancréatique murin.

L'Hypothèse est que l'imagerie fluorescente donnera des résultats comparables à ceux obtenus en TEP. Ainsi, on disposera d'une imagerie fonctionnelle performante et peu contraignante.

Cette étude constitue une preuve de concept. En cas de succès, cela permettra de disposer d'un outil ultrasensible pour la détection tumorale notamment en peropératoire (endoscopique, chirurgicale ou robotique).

Cette étude ne peut pas être remplacée par une méthode alternative puisque son objectif est une imagerie in vivo de la progression tumorale. Il existe un modèle murin transgénique, récapitulant les différents stades de la progression tumorale pancréatique observée chez l'Homme. La grande reproductibilité du modèle et son utilisation fréquente ont permis d'établir des points limites précoces et prédictifs limitant ainsi au maximum la souffrance animale lors de l'utilisation du modèle. Les points de réalisation de l'imagerie sont suffisamment précoces pour que les dommages attendus sur les animaux soient modérés. Leur nombre est réduit (n=16 souris maximum) car les méthodes d'imagerie évaluées ne sont pas invasives et permettent une étude longitudinale. Un raffinement continu des pratiques d'expérimentation sera pratiqué. Afin de réduire le stress, les souris seront hébergées dans des cages aux normes avec des formes d'enrichissement (nids, igloos) à disposition.

8482 La formation spécifique destinée aux personnes concevant ou réalisant des procédures expérimentales chirurgicales est une formation obligatoire pour toutes les personnes détenant l'habilitation à l'expérimentation animale fonction A et B désireuses de mettre en œuvre des procédures expérimentales chirurgicales.

Cette formation est dispensée par un vétérinaire et assistant ingénieur déjà détenteur de la formation et avec une expertise en chirurgie expérimentale. Cette formation se déroulera pendant 5 ans (en plusieurs sessions de 3 jours) et elle comptera 5 stagiaires pour chaque session.

Afin d'optimiser les travaux pratiques et de réduire l'utilisation d'animaux et d'inclure le raffinement et le remplacement, les stagiaires devront en premier lieu suivre une partie théorique sur les fondamentaux en chirurgie (anesthésie, analgésie, aseptie) et réaliser des travaux dirigés sur modèles non vivant, des Rats en PVC sur lesquels ils devront apprendre les gestes de base tels que les principes d'hémostase et les sutures. A la fin de ces travaux dirigés les stagiaires seront évalués et seules les personnes qui auront obtenu la moyenne sur leur évaluation seront autorisées à continuer la formation sur animaux vivants. Nous réaliserons 3 sessions par an pendant 5 ans de 5 stagiaires pour chaque session, nous utiliserons donc au total 75 rats pour la totalité du projet, qui est le minimum d'animaux requis (un rat par stagiaire).

La formation se déroulera en 3 TP de 3 heures chacun. Un TP de laparotomie simple avec description des différentes étapes, un de néphrectomie du rein gauche avec réveil de l'animal et un de splénectomie avec euthanasie terminale.

Tous ces actes chirurgicaux seront réalisés sous la surveillance des formateurs qui veilleront à ce que la médication pré et post opératoire pour la gestion de l'analgésie soit bien effectuée. Les rats seront hébergés au sein d'une animalerie agréée dans des conditions de température et d'hygrométrie optimum et nous réaliserons un suivi clinique quotidien des animaux afin de palier le cas échéant à toute détresse et/ou souffrance.

8483 La souris glaneuse est une des rares espèces de mammifères chez laquelle on a décrit une division du travail lors de la construction collective du tumulus. Le tumulus est construit au début de l'automne par des souris juvéniles. Il va servir d'abri pour l'hivernage et la qualité de sa construction joue un rôle certain sur la survie des individus. L'édification du tumulus comprend une série d'étapes successives. Certaines de ces étapes, correspondant à des tâches de transport, peuvent être reproduites en laboratoire et grâce à l'utilisation de la RFID (Radio Frequency Identification Device), il est possible de quantifier l'investissement de chaque individu à chacune de ces tâches. On montre alors que dans un groupe de six individus, deux individus sont des spécialistes du transport, et que les autres sont soit des transporteurs occasionnels, soit des non-transporteurs. L'identité des spécialistes diffère suivant la tâche et il y a donc bien des spécialistes de chacune des tâches et donc une division du travail. En dehors de l'espèce humaine, la division du travail a été essentiellement étudiée chez les insectes sociaux et un certain nombre de modèles de base tentent d'expliquer l'émergence de ces spécialisations. La souris glaneuse semble correspondre au modèle des seuils, qui est basé sur des seuils de réponse différents à un stimulus suivant les individus. Les individus les plus réactifs à un matériau deviendront des transporteurs de ce matériau. On a aussi montré que les individus qui devenaient des transporteurs étaient les plus proactifs lorsqu'on les évaluait avant la tâche de transport. Si on enlève un des transporteurs du groupe, on obtient une réorganisation complète du rôle de chacun des individus restants. Néanmoins l'organisation générale du travail reste inchangée avec des transporteurs, des transporteurs occasionnels et des non-transporteurs. On pourrait penser qu'un transporteur joue un rôle important dans l'organisation du groupe, qu'il s'agit d'un individu clef. Néanmoins, on obtient le même résultat (i.e. redistribution des rôles et maintien de la division du travail) en enlevant un non transporteur. La stabilité de l'organisation du travail suggère la force de l'auto-organisation du processus mais les processus de redistribution des tâches parmi les individus demeurent une énigme. Le but de ce projet est d'étudier comment se fait la redistribution des tâches en prenant en compte l'évaluation des traits de personnalité des individus et leur expérience de transport.

- Réduire le nombre d'animaux en expérimentation : l'étude porte sur 14 groupes de 6 individus des deux sexes et issues de portées différentes. Le nombre de groupes (N = 14) permet d'avoir suffisamment de données pour mener à bien les analyses statistiques. Les animaux surnuméraires au sein de chaque portée sont conservés dans le stock de l'élevage.

- Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites. Il s'agit d'expériences sur le comportement n'entraînant pas de stress majeur pour les animaux. La pose des transpondeurs est une pratique de marquage courante sur les animaux domestiques et a déjà été validée pour l'espèce étudiée. Le maintien en fratrie ne pose aucun problème pour cette espèce et correspond à la structure sociale en milieu naturel.

- Remplacer les modèles animaux. Le modèle animal, en l'occurrence la souris glaneuse, est l'objet d'étude et ne peut donc être remplacé. Les connaissances acquises sur cette espèce peuvent contribuer à améliorer les gestions des espaces agricoles où vit la souris glaneuse.

8484 Les maladies chroniques du foie sont très fréquentes. D'après les estimations, elles affectent 2,8% de la population générale en France et sont responsables de plus d'un million de décès par an dans le monde. La stéatose métabolique (communément appelée stéatose non-alcoolique [NAFLD]) est associée à la surcharge pondérale et au diabète de type 2. C'est aujourd'hui la maladie du foie la plus fréquente, avant même les hépatites virales chroniques ou la consommation excessive d'alcool. La mort des cellules du foie est ce qui conduit à la progression de toutes les maladies du foie vers la cirrhose et le cancer du foie. L'hypothèse que nous formulons dans ce projet est que la nécroptose, une nouvelle forme de mort cellulaire programmée induisant de l'inflammation et contrôlée par la kinase RIPK3, est impliquée dans la progression des maladies du foie, et qu'une nouvelle stratégie thérapeutique dans ces maladies consisterait à bloquer la nécroptose.

Le projet vise à identifier la contribution de la nécroptose à la stéatose métabolique et une maladie biliaire rare, la cholangite sclérosante primitive (CSP), deux maladies pour lesquelles il n'existe pas à ce jour de traitement efficace, et qui ciblent des types cellulaires différents du foie. Pour ce faire, nous combinerons une recherche sur des modèles de stéatose métabolique et de CSP chez des souris génétiquement modifiées pour inhiber les voies de la nécroptose dans différents types cellulaires

(hépatocytes, cholangiocytes et macrophages) avec l'analyse de souris type sauvage commerciales obèses traitées avec des inhibiteurs de la nécroptose que nous avons récemment identifiés.

La perspective est de développer de nouveaux traitements pour prévenir la mort des cellules du foie et par conséquent réduire le développement des complications de type cirrhose ou cancer chez les patients atteints de maladies hépatiques.

Type d'animaux : Souris transgéniques invalidées/contrôles pour le gène d'intérêt dans différent contexte et souris type sauvage commerciales pour une partie du projet.

Nombre d'animaux :

Ce projet impliquera l'utilisation d'un total de 1000 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. 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 continu. De plus, une démarche constante de raffinement sera mise en œuvre grâce à l'amélioration permanente des conditions d'hébergement (enrichissement, soins, etc.) et des procédures décrites dans ce projet.

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

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

Raffinement : Dans la réalisation de ce projet, l'ensemble des procédures ont été mise au point afin de permettre une interprétation fiable dans le respect du bien-être animal, en limitant la douleur et le stress. Les conditions d'hébergement sont conformes à la réglementation, les animaux disposent de nourriture et d'eau ad libitum. Le milieu est enrichi à l'aide de coton de nidification ou de maison de type igloo. Nous nous efforçons à chaque instant de raffiner nos procédures afin de garantir le bien-être des animaux en cours de procédure grâce à une surveillance attentive et des soins adaptés.

8485 La recherche de notre équipe est d'analyser les bases cellulaires de l'hyperémie fonctionnelle, c'est à dire le lien entre l'activation cérébrale et l'augmentation réflexe du flux sanguin, lien qui est à la source de l'imagerie fonctionnelle cérébrale de type fIRM chez l'homme.

Notre but est donc de caractériser l'ensemble des types de cellules cérébrales (tels les neurones ou les cellules gliales) participant à la régulation de ce phénomène.

Plus précisément, nous projetons d'étudier, dans le bulbe olfactif du rongeur les réponses calciques cellulaires et vasculaires à la présentation d'odeur ou à la photoactivation. Nous poursuivrons cette étude dans des modèles pathologiques.

Sur le plan technique, nous observerons ces réponses en utilisant la microscopie bi-photonique, l'imagerie ultrarapide ultrasonore (« ultrafast ultrasounds ») et l'électrophysiologie.

Les différentes procédures expérimentales ont été consciencieusement élaborées afin d'utiliser le moins d'animaux possibles. Notre approche, limitera le nombre d'animaux utilisés dans la mesure où les réponses cérébrales seront enregistrées simultanément avec plusieurs techniques. Il n'existe pas de méthode alternative possible.

Nous nous attacherons à réduire au maximum la souffrance des souris. Une grille d'évaluation de la douleur est adaptée à ce projet, évaluant l'état général de l'animal et la perte de poids. Des antalgiques sont prévus tout au long de ce projet, et une douleur trop élevée entraînera l'euthanasie de l'animal. Une douleur trop élevée entraînera l'euthanasie de l'animal.

L'étude du couplage neurovasculaire impose l'utilisation de certains mammifères, tels le rat ou la souris. Seule la souris est une espèce chez laquelle il est aisé de générer des animaux transgéniques, le rat est un des rares modèles de pathologie du système glymphatique dans lequel l'hyperémie est

altérée. Le poisson zèbre est un mauvais modèle pour étudier le couplage neurovasculaire. Afin d'analyser le rôle des principaux types de cellules du cerveau participant à l'hyperémie fonctionnelle, 10 modèles de souris transgéniques seront utilisés par an, à raison de 32 souris par modèle et 32 souris contrôles soit 352 souris chaque année. Pour les 5 ans du projet, le nombre de rongeur s'élève à 1760 souris. Et un modèle de rats, à raison de 10 rats par an, soit 50 rats pour les 5 ans.

A long terme ce projet permettra

- 1) de comprendre les mécanismes physiologiques régulant le flux sanguin cérébral,
- 2) de comprendre la nature et les limites des signaux utilisés en imagerie fonctionnelle de type IRM chez l'homme,
- 3) de déterminer les bases physiopathologiques de certaines pathologies telles l'ischémie et la maladie des petits vaisseaux. qui rentrent en jeu dans tous les types de maladies neuro-vasculaire et ainsi améliorer les futurs traitements.

Ces résultats contribueront à mieux comprendre les limites de l'imagerie humaine.

8486 Les patients atteints d'épilepsie présentent des crises liées à une activité exagérée et incontrôlée de certaines zones de leur cerveau. Les crises sont liées à différents facteurs, notamment une inflammation du cerveau qui à son tour dépend de l'état des vaisseaux sanguins et de ce qu'on appelle la Barrière Hémato-Encéphalique (BHE). Cette structure est une barrière presque étanche entre la circulation du sang et le cerveau. Elle est composée de différents types cellulaires (cellules endothéliales, lame basale, péricytes, astrocytes). En particulier les péricytes sont des cellules qui peuvent changer de forme et activité en réponse à des stimuli pathologiques. Par exemple, un remodelage morphologique des péricytes a été observé dans l'épilepsie chez l'Homme et dans des modèles animaux. Le projet pour lequel nous demandons l'autorisation vise à savoir si la réactivité des péricytes participe à l'inflammation pendant les crises épileptiques.

A cette fin nous utiliserons des souris (nommées NG2-DsRed) dont les péricytes expriment une protéine fluorescente rouge qui en permet la localisation et l'analyse morphologique sous différentes conditions. A ce jour il n'existe pas d'autre moyen fiable pour identifier ces cellules, d'où l'intérêt d'utiliser ces souris. Nous utiliserons un modèle d'épilepsie induit par une injection unique d'un composé qui induit des convulsions, le kainate (KA), dans un endroit précis du cerveau de ces souris (l'hippocampe). Cette injection provoque d'abord une crise prolongée non convulsive (dite "status epilepticus", SE) suivie par une phase asymptomatique qui aboutit, 3 semaines plus tard, à des crises épileptiques spontanées. Ce modèle mime fidèlement plusieurs aspects d'un type d'épilepsie retrouvée chez l'Homme, dite "épilepsie du lobe temporal" : inflammation, sclérose de l'hippocampe, mort neuronale, crises épileptiques de type partiel.

Grâce à ce modèle nous suivrons les modifications des péricytes en parallèle avec l'état inflammatoire dans le cerveau à différents temps après induction de l'épilepsie. Nous mesurerons l'activité cérébrale (par vidéo-EEG) et la performance cognitive (par analyse comportementale). Les animaux seront euthanasiés et les cerveaux utilisés pour des analyses biochimiques et immunohistochimiques.

Cette demande d'autorisation concerne l'utilisation de 6 souris de chaque sexe pour chaque condition et temps, pour un total de 226 souris.

Remplacer : A ce jour et après recherche approfondie sur les bases de données disponibles, le système neuro-vasculaire présente une complexité qui n'est pas reproductible par des méthodes in vitro basées sur la culture cellulaire.

Réduire : Le nombre d'animaux utilisés sera réduit grâce à une approche rationnelle et au double emploi de certains animaux lorsque possible. Plusieurs informations seront obtenues grâce à différentes mesures possibles sur le même animal : i) performance cognitive; ii) progression des crises épileptiques; iii) modifications morphologiques des péricytes, de la vascularisation et de l'état d'inflammation liées à la progression des crises épileptiques.

Raffiner : Nous veillerons à que le bien-être des animaux soit garanti par différents moyens : hébergement dans des conditions optimales, anesthésie selon les recommandations vétérinaires, analgésie et suivi post-opératoire, visites régulières par la cellule interne Bien-Etre Animal.

8487 *Staphylococcus aureus* est une bactérie pathogène opportuniste de l'homme et de l'animal présente de manière asymptomatique chez environ 30% de la population. Elle est néanmoins une cause majeure de bactériémies, d'endocardites et peut causer des infections de la peau et des tissus mous au sein de la communauté, en particulier si la barrière cutanée est compromise. Une immunodépression ou une hospitalisation de longue durée augmente par ailleurs le risque de développer une infection disséminée à *S. aureus* et la survenue de choc septique, de pneumonie ou d'ostéomyélite. L'émergence et la propagation d'isolats de *S. aureus* résistants à la méticilline (SARM), qui sont résistants aux bêta-lactamines, antibiotiques les plus utilisés en clinique humaine, et très fréquemment résistants à de nombreuses autres familles d'antibiotiques, pose par ailleurs un réel souci de santé publique. Le CDC estime qu'annuellement plus de 80 000 infections et 11 200 décès peuvent être attribués aux SARM aux USA. En France, ce sont plus de 7500 cas d'infections à SARM qui ont été recensés entre 2005 et 2008 dans les établissements de santé du territoire national.

La colonisation des cavités nasales et/ou de la peau par *S. aureus* est la porte d'entrée de ce pathogène et précède la survenue d'épisodes infectieux pouvant mettre en jeu la vie des patients. Des études ont cependant montré que certains individus ne sont jamais colonisés par *S. aureus* malgré des expositions répétées. Cette résistance a été expliquée par la présence d'un microbiote bactérien naturel et particulier capable d'inhiber la colonisation des muqueuses nasales ou de la peau par *S. aureus*. En étudiant le microbiote nasal de patients susceptibles ou résistants à la colonisation par *S. aureus*, nous avons pu identifier une combinaison de bactéries capable d'entraver la multiplication de *S. aureus*. L'étude de ces souches au laboratoire a permis de démontrer la capacité de certaines combinaisons de bactéries naturellement présentes au niveau des narines à significativement ralentir la croissance de *S. aureus*, SARM ou SASM, in-vitro. Afin de déterminer la meilleure association de bactéries capable de prévenir la colonisation par *S. aureus* dans un environnement complexe proche des conditions retrouvées chez l'homme, le développement d'un modèle pertinent in-vivo apparaît maintenant indispensable.

Notre projet a pour but d'obtenir un modèle murin de colonisation nasale et cutanée permettant de démontrer l'efficacité in-vivo de notre traitement et de définir les conditions permettant une réduction maximale voir l'inhibition de la colonisation par *S. aureus* dans un modèle pertinent. Pour ce faire nous emploierons des souris qui se verront appliquer le traitement expérimental, soit par application sur la peau saine de souris Nude (naturellement dépourvues de pilosité), soit par instillation nasale sur souris Balb/C, ces interventions ne causant pas de stress, ni de traumatisme aux animaux. L'efficacité du traitement sera évaluée par sa capacité à inhiber la croissance d'une dose définie de *S. aureus* délivrée au site du traitement expérimental (cutané ou cavité nasale) et se fera par comparaison au nombre de *S. aureus* après 24 heures recueillis chez des animaux contrôles ne recevant pas le traitement et des animaux traités. Les souris seront suivies et euthanasiées dans un délai maximum de 48 heures après le début de l'expérience ou dès que leur état le nécessite et se fera en accord avec les règles garantissant le bien-être des animaux. Il est cependant attendu que le traitement expérimental ainsi que les souches tests de *S. aureus* n'aient pas d'effet délétère sur la santé et le bien-être des animaux. Cette étude est un prérequis nécessaire au développement d'un traitement à visée humaine et se base sur des publications décrivant déjà en partie les modèles qui seront adaptés ici à notre problématique.

La rédaction de notre protocole a été effectuée en se conformant aux règles de remplacement, réduction et de raffinement visant à réduire l'usage des animaux à des fins de recherche scientifique.

Suite aux essais in-vitro, la démonstration de l'innocuité et de l'efficacité de notre traitement dans un modèle in-vivo pertinent est une étape nécessaire au développement de tout traitement à visée humaine. La reconnaissance et l'acceptation de la pertinence des souris comme modèle ainsi que l'existence d'une littérature scientifique décrivant les techniques employées ont conditionné le choix de cette espèce pour notre étude qui utilisera 215 souris Balb/C et 279 souris Nude, soit un total de 494 souris.

Chaque condition expérimentale sera testée sur des groupes réduits de 5 souris. Ce nombre nous permettra d'effectuer une étude statistique des résultats afin de conclure sur la significativité des différences observées entre les groupes en fonction de la condition étudiée.

La souris étant un animal social, les individus seront hébergés par cage de 6 individus maximum conformément aux recommandations des responsables du bien-être des animaux. Toute intervention anxiogène pour l'animal sera réalisée sous anesthésie générale pour limiter le stress. Leur environnement sera agrémenté de copeaux de bois et enrichi avec du coton permettant ainsi aux souris d'avoir un environnement répondant à leurs besoins comportementaux et physiologiques. Afin de limiter la souffrance des animaux, une évaluation journalière de leurs comportements sera réalisée et documentée avec attribution d'un score clinique selon la sévérité des symptômes observés. Des signes de souffrance ne pouvant être pris en charge seront considérés comme points limites et donneront lieu à l'euthanasie de l'animal.

Cette étude nous permettra de démontrer l'innocuité de notre formulation et de confirmer son efficacité dans des conditions précliniques. Elle nous permettra également de définir les limites d'efficacité et de définir les proportions idéales de chaque composant du microbiote bactérien synthétique développé.

8488 Les entérocoques, notamment *Enterococcus faecium*, sont des bactéries qui appartiennent à la flore intestinale normale de l'homme et qui sont responsables de nombreuses infections et épidémies hospitalières. L'émergence de certaines souches bactériennes multi-résistantes aux antibiotiques rend difficile la prise en charge des infections dues à ces bactéries. De plus, *E. faecium* est capable de faire face à de nombreux stress environnementaux grâce à une importante capacité d'adaptation. Tous les mécanismes d'adaptation ne sont pas connus, mais différents types de régulateurs semblent intervenir. Parmi eux, les petits ARN (sARN) semblent jouer un rôle majeur. Récemment l'existence de différents sARN exprimés chez *E. faecium* a été démontrée pour la première fois au laboratoire, mais il n'existe actuellement aucune donnée sur le rôle précis de ces sARN.

L'objectif du projet est de mieux comprendre le rôle des sARN dans les mécanismes d'infection sévère.

Des bactéries modifiées génétiquement dans lesquels chaque sARN sera enlevé seront préalablement créées (souche délétée). Un modèle d'infection sévère (endocardite infectieuse, infection grave des valves cardiaques) sera ensuite réalisé chez le rat. Des lésions cardiaques similaires à celles retrouvées dans l'endocardite humaine seront induites chirurgicalement sous anesthésie générale. Une suspension bactérienne sera secondairement injectée par voie veineuse, et les animaux seront surveillés quotidiennement. Cinq jours après l'infection, les valves cardiaques, la rate, le foie et les reins seront mis en culture afin de quantifier les bactéries

et ainsi déterminer l'implication des différents sARN dans l'infection.

Concernant la règle des 3R :

- Réduire : Le nombre d'animaux a été réduit au maximum tout en gardant un effectif correct pour une étude statistique fiable. Le nombre de souches a été réduit au maximum, sur les 61 sARN mis en évidence, dix ont été sélectionnés en raison de leur implication dans la virulence démontrée chez d'autres bactéries, ou parce qu'ils sont exprimés lors d'un stress antibiotique, ou chez des souches responsables d'épidémies hospitalières. Au total, 530 rats seront utilisés.

- Raffiner : Les animaux seront élevés dans des conditions favorables à leur bien-être, dans des cages de taille appropriée, par groupe de deux. L'environnement sera enrichi à l'aide de morceaux de coton, l'alimentation sera contrôlée et les soins quotidiens seront apportés par du personnel qualifié. Pour chaque procédure, les animaux seront surveillés quotidiennement avec évaluation de leur aspect physique, de leur comportement, de leur température corporelle et de leur poids.

- Remplacer : Il n'existe actuellement aucune méthode alternative à l'expérimentation animale permettant d'étudier l'effet in vivo des sARN.

8489 Au niveau réglementaire, le criblage du potentiel perturbateur endocrinien (PE) des substances est réalisé à l'aide de différents tests. Parmi ces tests, la ligne directrice 230 (OCDE TG230 ; test in vivo 21 jours chez le poisson) permet la détection des substances (anti)-œstrogéniques, (anti)-androgéniques et des inhibiteurs d'aromatase. Toutefois, à l'heure actuelle, ce test présente quelques limites. En effet, les perturbations des voies de synthèse des androgènes et des œstrogènes ne sont détectées qu'à partir de mesures indirectes (perturbation de l'expression du gène hépatique

ER-dépendant de la vitellogenine) sans prendre en compte les perturbations directes de l'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de ces androgènes et œstrogènes. Ce type de mesure indirecte représente une limite de ce test dans le sens où elle ne permet pas la distinction entre les perturbations directes de la voie de synthèse des œstrogènes par les polluants et une simple hépatotoxicité de ces molécules. Des mesures directes permettront de définir clairement les mécanismes de perturbation des composés testés.

Ce projet s'inscrit donc dans une optique d'amélioration de cette ligne directrice 230 à l'aide de poissons zèbres génétiquement modifiés afin d'apporter des informations supplémentaires à l'aide du même nombre d'animaux.

Au laboratoire, nous disposons de deux lignées de poissons zèbres transgéniques, exprimant une protéine fluorescente (GFP) sous contrôle de promoteurs d'enzymes de la stéroïdogénèse, i.e. Cyp19a1a (aromatase A, responsable de la synthèse des œstrogènes dans les gonades essentiellement) et Cyp11c1 (11 β -hydroxylase, responsable de la synthèse des androgènes 11-oxygénés). Ces lignées transgéniques ont été croisées avec une lignée mutante de poissons zèbres transparents (lignée « casper »), afin de permettre une lecture plus aisée de la fluorescence de la GFP in vivo quand cela est possible.

Dans ce projet nous nous proposons d'utiliser ces lignées de poissons zèbres transgéniques novatrices (cyp19a1a-GFP/casper et cyp11c1-GFP/casper) couplées à une analyse quantitative de la fluorescence de la GFP via l'imagerie de l'animal afin d'alléger et de raffiner le test de criblage in vivo du caractère PE des substances déjà existant (OCDE TG230). L'utilisation de la lignée cyp19a1a-GFP permettra d'apporter une réponse directe quant au potentiel inhibiteur d'aromatase des composés, mais également quant au potentiel inducteur d'aromatase, ce qui n'est pas envisageable avec le test actuel et ainsi d'amener des informations sur les perturbations de la voie de biosynthèse des œstrogènes. L'utilisation de la lignée cyp11c1-GFP renseignera quant à elle de la capacité des composés à perturber la voie de biosynthèse des androgènes 11-oxygénés.

Dans ce projet, nous étudierons les effets de différentes substances (6 au total) sur l'expression de la GFP dans les gonades des deux lignées précédemment citées au cours de l'exposition aux substances (0, 7, 14 et 21 jours d'exposition), ainsi que sur l'expression de la vitellogénine et des stéroïdes circulants (œstradiol, 11-kéto-testostérone), et sur la gamétogenèse si besoin. Les substances d'exposition incluront à la fois des substances modèles (œstradiol : œstrogène de référence; prochloraz : inhibiteur d'aromatase) et des substances d'intérêt environnemental pour lesquelles les dangers et les risques sont encore peu caractérisés vis-à-vis du caractère PE (le choix n'est pas figé toutefois il pourrait s'agir de substituts du bisphénol A ou encore de progestatifs de synthèse qui sont capables de perturber la biosynthèse hormonale chez le poisson). En effet, certains substituts du bisphénol A tels que le bisphenol S, ainsi que certains progestatifs de synthèse. Pour chaque substance, 3 concentrations seront testées en plus du témoin solvant et du témoin eau. Ces concentrations seront une combinaison de concentrations environnementales et de concentrations plus élevées permettant une quantification de la molécule d'intérêt et si possible de ses métabolites dans les tissus des poissons exposés. Au final ces expérimentations utiliseront 150 poissons zèbres de chaque lignée par substance, soit un total de 1800 poissons sur les 3 ans de projet (10 poissons/aquarium (comme préconisé dans la TG230) x 3 répliques x 5 conditions x 2 lignées x 6 substances = 1800 poissons). Au cours de ces expérimentations une grille de score permettant d'évaluer la souffrance des animaux (s'il devait y en avoir) sera utilisée, et permettra, en cas de souffrance détectée, de stopper les expérimentations.

In fine, l'utilisation de ces lignées transgéniques vise à apporter des informations complémentaires sur les mécanismes d'action des composés PE, non prises en compte dans les tests actuels, i.e. impact potentiel des molécules testées sur l'expression gonadique de l'aromatase et de la 11 β -hydroxylase. D'autre part, le raffinement des tests se fera via la quantification de la fluorescence par imagerie du petit animal au cours et/ou à l'issue de l'exposition ce qui devrait permettre de réduire les temps d'analyse sans pour autant augmenter le nombre de poissons nécessaires. Enfin, les cibles moléculaires étant fonctionnellement liées avec des processus physiologiques clefs tels que la gamétogenèse et la différenciation sexuelle, les informations toxicologiques acquises permettront d'intégrer ces données mécanistiques pour prédire les effets des molécules au niveau individuel via le raffinement et/ou l'élaboration d'AOP.

Au cours de ce projet, les poissons zèbres seront gardés dans des environnements connus pour engendrer un minimum de stress. Le poisson zèbre étant une espèce grégaire, ils seront hébergés en groupes d'au moins 8 poissons afin d'éviter les comportements d'anxiété engendrés par l'isolement, tout en conservant des densités de population faibles évitant ainsi les comportements agressifs. De plus, les poissons seront nourris pour partie avec des artémies vivantes, leur permettant ainsi d'enrichir l'éventail de leurs comportements sociaux par le comportement de chasse.